

**Die Retinogenese im dreidimensionalen
Zellkultursystem des Huhns:
Eine zell- und molekularbiologische Studie
neurotropher Funktionen der Zytokine GDNF,
BDNF und PEDF**

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur

Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
genehmigte
Dissertation von

Dipl.- Biol. Katja Eberhardt

aus Wiesbaden

Wiesbaden 2007

Dekan des Fachbereichs Biologie an der TU-Darmstadt: Prof. G. Thiel

1. Referent: Prof. Dr. P.G. Layer
2. Referent: Prof. G. Thiel

Tag der Einreichung: 20. Juni 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2007

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2003 bis Juni 2007 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul G. Layer am Institut für Zoologie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Professor Paul G. Layer für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, für die Überlassung des Themas, für seine Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für das konstruktive Interesse, welches er dieser Arbeit entgegen gebracht hat.

Herrn Professor Gerhard Thiel danke ich für Übernahme des Korreferats.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Gesine Bachmann, Michaela Becker-Röck, Frau Jutta Huhn und Frau Meike Stotz-Reimers, die mir jederzeit mit Rat und Tat, sei es auf der fachlichen, als auch auf der moralischen Ebene, beigestanden haben.

Ebenfalls für deren Unterstützung und Freundschaft dankbar bin ich Frau Vanessa Jacob, Herrn Peter Wolf und Frau Anna Salz.

Die einzigartige Atmosphäre der Arbeitsgruppe Layer und die große gegenseitige Unterstützung aller Mitglieder hat zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen: Deshalb ein großer Dank an: Frau Dr. Laura E. Paraoanu, Herrn Matthias Rieke, Herrn Florian Frohns, Frau Ulrike Hoppe und Kirsten Wehner und all die anderen. Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Andrée Rothermel danken, der zu den richtigen Zeitpunkten, wertvolle Ratschläge gegeben hat.

Nicht zuletzt gilt mein großer Dank meiner Familie, insbesondere Herrn Marc Eberhardt, deren Unterstützung und Rückhalt ich mir in jeder Hinsicht sicher sein konnte.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Hühnerretina als Modellsystem	1
1.1.1 Die Entwicklung der Retina verläuft in klaren Mustern	2
1.1.2 Der Aufbau der Retina	3
1.2 Retinale Zelltypen und ihre Spezifikationen	4
1.2.1 Photorezeptoren sind die lichtempfindlichen Sehzellen in der Retina	4
1.2.2 Dopaminerge Amakrinzellen in der Retina	5
1.2.3 Müllerzellen sind die Glia der Retina	5
1.3 Neurotransmitter als Zellmarker	6
1.3.1 Monaminerge Neurotransmitter in der Retina	6
1.3.2 Das cholinerge System in der Retina	8
1.4 Neurotrophe Faktoren als Vermittler entwicklungs- biologischer Prozesse	9
1.4.1 Der <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> (GDNF)	10
1.4.2 Der <i>pigment epithelium-derived factor</i> (PEDF)	13
1.4.3 Der <i>brain-derived neurotrophic factor</i> (BDNF)	16
1.5 Embryonale Retinazellen im dreidimensionalen Zellkultur- system	18
2 ZIELSETZUNG	21
3 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Materialien	23
3.1.1 Chemikalien	23
3.1.2 Aggregationsmedium und -zusätze	24
3.1.2.1 Zusammensetzung der Medien und Pufferlösungen	25
3.1.3 Antikörper	26
3.1.4 Enzyme	27
3.1.5 Primer	27

3.1.6	Reaktionsansätze	28
3.1.7	Bakterienstämme	29
3.1.8	Vektoren	29
3.1.9	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	29
3.1.10	Geräte	29
3.1.11	Filme	30
3.1.12	Software	30
3.1.13	Versuchstiere	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Lagerung und Bebrütung der Eier	32
3.2.2	Präparation embryonaler Augen	32
3.2.3	Herstellung von Rosettensphäroidkulturen	32
3.2.3.1	Ansetzen von Rosettensphäroidkulturen	33
3.2.4	Fixierung und Herstellung von Gefrierschnitten	34
3.2.4.1	Ernten und Fixieren von Rosettensphäroiden für Gefrierschnitten	34
3.2.4.2	Herstellung von Gefrierschnitten von Rosettensphäroiden	34
3.2.5	Ernten und Herstellung von Homogenaten	34
3.2.6	Ernten von Rosettensphäroiden für RNA-Isolierung	35
3.2.7	Transfektion eukaryotischer Zellen (Kalziumphosphatpräzipitation)	35
3.2.8	Immunhistochemische Färbungen von Rosettensphäroiden	36
3.2.8.1	Blockierung unspezifischer Bindestellen	37
3.2.8.2	Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper	37
3.2.8.3	Eindecken der Objektträger	38
3.2.9	Proliferationsnachweis mittels einer PCNA-Färbung	39
3.2.10	Zelltod-Detektion mit Hilfe des TUNEL-Assays	39
3.2.11	Karnovsky-Roots-Färbung	39
3.2.12	Western-Blot-Analyse	40
3.2.12.1	Proteinbestimmung nach Bradford	40
3.2.12.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	41
3.2.12.3	Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran	42
3.2.12.4	Antikörperreaktion	42
3.2.12.5	Detektion	42
3.2.13	Isolierung von Gesamt-RNA	43
3.2.13.1	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	43
3.2.14	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion	44
3.2.14.1	RT-Reaktion	44
3.2.14.2	PCR-Amplifikation	45

3.2.15	Klonierung von PCR-Fragmenten	47
3.2.15.1	PCR-Amplifikation für die Klonierung in den pCRII-Vektor	47
3.2.15.2	Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
3.2.15.3	Ligation in den pCRII-Vektor	48
3.2.15.4	Transformation	48
3.2.15.5	Mini-Plasmidpräparation zur Überprüfung der Klone	49
3.2.15.6	Restriktionsanalyse	50
3.2.15.7	Midi-Plasmidpräparation	51
3.2.16	Subklonierung in den pCMS-EGFP-Vektor	51
3.2.16.1	Restriktion von Plasmidvektoren	52
3.2.16.2	Ligation in pCMS-EGFP-Expressionsvektor	52
3.2.17	Kryokonservierung von <i>E.coli</i> -Zellen	53
3.2.18	Sterilisation von Medien und Glaswaren	53
3.2.19	Dokumentation und Bildbearbeitung	54
4	ERGEBNISSE	55
4.1	Analyse der für die Entwicklung relevanten Effekte von neurotrophen Faktoren durch <i>gain-of-function</i>-Experimente	55
4.1.1	Die Proliferationsrate in Rosettensphäroiden wird durch GDNF, PEDF und BDNF signifikant gesteigert	55
4.1.2	Die Zugabe von exogenen GDNF, PEDF oder BDNF führt zu einer signifikanten Abnahme von Apoptose in Rosettensphäroiden	59
4.1.3	Die Organisation der Rosettensphäroidstruktur wird durch PEDF erheblich gestört, durch GDNF aber stimuliert	62
4.1.3.1	GDNF stimuliert die Ausbildung und das Überleben von Müllerzellen	63
4.1.3.2	GDNF vermag die Struktur-störenden Effekte von PEDF aufzuheben	65
4.1.4	Die Bedeutung von GDNF, PEDF und BDNF für entwickelnde Photorezeptoren	67
4.1.4.1	GDNF erhöht die Zellzahlen der Stäbchen, aber nicht der Zapfen	68
4.1.4.2	Exogenes GDNF erhöht signifikant die Rhodopsin mRNA-Expression	72
4.1.4.3	Exogenes GDNF hat keinen Einfluss auf die Expression von Zapfen-Opsinen	74
4.1.4.4	Exogenes PEDF zeigt dramatische Effekte für Zellzahlen von Stäbchen und Zapfen	76
4.1.4.5	Exogenes PEDF führt zu zwei gegensätzlichen Effekten für das Expressionsmuster von Stäbchenrhodopsin	80

4.1.4.6	Die Zugabe von exogenen PEDF führt zu einem signifikanten Anstieg in der Opsin-Expression	82
4.1.4.7	BDNF zeigt keine signifikanten Effekte für Stäbchen und Zapfen	86
4.1.4.8	Einen Einfluss von BDNF auf Photorezeptoren kann auch auf der mRNA-Expressionsebene nicht nachgewiesen werden	89
4.1.4.9	Die Effekte von GDNF werden durch BDNF potenziert	91
4.1.4.10	Die Kombination von GDNF und PEDF führt zu gegensätzlichen Effekten	94
4.1.5	Der Einfluss von GDNF, PEDF und BDNF auf Zellen der INL	97
4.1.5.1	BDNF erhöht die Zellzahlen der Amakrinzellen, PEDF mindert sie	97
4.1.5.2	BDNF erhöht die AChE-Aktivität	100
4.1.5.3	GDNF erhöht die Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA	101
4.1.5.4	GDNF erhöht die Proteinexpression der Tyrosinhydroxylase (TH)	103
4.2	Die Unterdrückung von GDNF zeigt signifikante Konsequenzen für die entwickelnde Retina <i>in vitro</i> (<i>loss-of-function</i>-Experimente)	105
4.2.1	Unterdrückung der endogenen GDNF-Expression durch den Einsatz eines GDNF <i>antisense</i> -Expressionsmuster	105
4.2.2	Transfektion mit der GDNF <i>antisense</i> -Sequenz beeinträchtigt das Wachstum von Rosettensphäroiden	107
4.2.3	Endogene GDNF mRNA-Expression wird nach Transfektion mit dem GDNF <i>antisense</i> -Expressionsmuster nahezu vollständig unterdrückt	108
4.2.4	Die Unterdrückung von GDNF mindert signifikant die endogene Expression von Stäbchenrhodopsin	110
4.2.5	Die Unterdrückung von GDNF verringert die Zahl der Stäbchen, aber nicht der Zapfen	112
4.2.6	Die Unterdrückung von GDNF vermindert die Anzahl der Islet-1 positiven Zellen	115
4.2.7	Der <i>Knock-down</i> von GDNF unterdrückt die Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA	117
5	DISKUSSION	
5.1	Neurotrophe Faktoren als bedeutende Vermittler für Entwicklungsprozesse	120
5.2	Neurotrophe Faktoren fördern die Differenzierung und das Überleben von Photorezeptoren	121
5.2.1	GDNF fördert das Überleben und die frühe Differenzierung von Stäbchen <i>in vitro</i>	121
5.2.2	PEDF wirkt prodifferenzierend auf Zapfen	125

5.2.3	GDNF kompensiert Effekte von PEDF	127
5.2.4	Effekte von GDNF werden durch BDNF potenziert	128
5.2.5	Photorezeptoren und der Bedarf an neurotrophen Faktoren	129
5.3	Störende Effekte von PEDF auf die Organisation des Rosettensphäroidsystems werden durch GDNF aufgehoben	132
5.4	GDNF ist essentiell für dopaminerge Amakrinzellen auch in der Retina	136
5.5	BDNF ist essentiell für Zellen der inneren Retina	138
5.5.1	BDNF fördert die Differenzierung und das Überleben von Amakrinzellen	139
5.5.2	BDNF erhöht die Komplexität von Synapsen und ist wichtiger Differenzierungs- und Überlebensfaktor für cholinerge Neuronen der Retina	139
5.6	GDNF fördert das Überleben von Ganglienzellen	140
5.7	Müllerzellen fungieren als Vermittlerstelle zwischen neurotrophen Faktoren und Zielzellen	141
5.8	Der Weg zu neuen Therapiemöglichkeiten liegt in der Kombination von Faktoren	144
5.9	Resümee und Ausblick	146
6	ZUSAMMENFASSUNG	148
7	LITERATURVERZEICHNIS	151

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Folgende Abkürzungen werden in dieser Arbeit verwendet:

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APS	Ammoniumperoxid-Disulfat
ART	<i>artemin</i>
b	Basen
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BChE	Butyrylcholinesterase
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CMZ	<i>ciliary margin zone</i> (ziliare Randzone)
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CNV	choridiale Neovaskularisierung
cRET	Rezeptor Tyrosin Kinase
CS	<i>chicken serum</i>
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DEPC-H ₂ O	DEPC-behandeltes Wasser
DEPC-PBS	DEPC-behandeltes PBS
dest.	Destilliert
DMEM	Dulbeccos modified Eagles medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
dT	Desoxythymidin
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendinitrotetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescend protein</i>
et al.	und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GCL	<i>ganglion cell layer</i> (Ganglienzellschicht)

GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidid protein</i>
GFL	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor family ligand</i>
GFR α	<i>GDNF-family receptor α</i>
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
IG	Immunoglobulin
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
INL	<i>inner nuclear layer</i> (innere nukleäre Schicht)
IOP	intraokularer Druck
IPL	<i>inner plexiform layer</i> (innere plexiforme Schicht)
K	Kulturtag
kB	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NaAcetat	Natriumacetat
NaCitrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
NT	<i>neurotrophin</i>
NTN	<i>neurturin</i>
OD	Optische Dichte
OFL	<i>optic fibre layer</i> (optische Faserschicht)
Oligo-dT	Oligodeoxythymidin
OLM	<i>outer limiting membran</i> (äußere limitierende Membran)
ONL	<i>outer nuclear layer</i> (äußere nukleäre Schicht)
OT	Objektträger
OPL	<i>outer plexiform layer</i> (äußere plexiforme Schicht)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Triton
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PEDF	<i>pigment epithelium-derived neurotrophic factor</i>

PFA	Paraformaldehyd
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pH	<i>pondus hydrogenium</i>
PSP	<i>persephin</i>
PSPA	<i>photoreceptor survival-promoting factor</i>
RH	Reinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	<i>reverse transcription</i> (Reverse Transkription)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TH	Tyrosinhydroxylase
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	Rezeptor Tyrosin Kinase
TUNEL	Tdt-vermittelte-dUTP-Einzelstrangbruch-Markierung
U	Unit
U/ μ g	Units pro Mikrogramm
U/ μ l	Units pro Mikroliter
UV	Ultra-Violett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

Abbildung 1	Aufbau und Entwicklung der Retinaschichten	3
Abbildung 2	Biosynthese der Katecholamine	7
Abbildung 3	<i>Crosstalk</i> zwischen den einzelnen Liganden und Rezeptoren	11
Abbildung 4	Das dreidimensionale Rosettensphäroidsystem als Repräsentant für eine Retina <i>in vitro</i>	20

MATERIAL UND METHODEN

Abbildung 5	Schematische Darstellung einer Antikörperfärbung	36
Abbildung 6	Schematische Darstellung der DNA-Elution durch die Zentrifugationsmethode	48

ERGEBNISSE

Abbildung 7	Proliferationsnachweis in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden des Kulturtages 2	56
Abbildung 8	Proliferationsnachweis in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden des Kulturtages 4	57
Abbildung 9	Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen in unbehandelten und behandelten Rosettensphäroiden der Kulturtage 2, 4, 6 und 8	58
Abbildung 10	Die exogene Zugabe von neurotrophen Faktoren führt zu einer signifikanten Abnahme der Apoptose in Rosettensphäroiden des Kulturtages 10	60
Abbildung 11	Nachweis der Sphäroidstruktur anhand der immunhistochemischen Färbung der Müllerzellen in Rosettensphäroiden des Kulturtages 10	62
Abbildung 12	Nachweis der Sphäroidstruktur anhand der immunhistochemischen Färbung der Müllerzellen in Rosettensphäroiden des Kulturtages 12	64
Abbildung 13	Organisation der Sphäroidstruktur in mit kombinierten Faktoren behandelten Rosettensphäroiden des Kulturtages 10	66
Abbildung 14	Größenverhältnisse der Rosettensphäroide nach der Behandlung mit kombinierten Faktoren	67
Abbildung 15	Der Effekt der Zugabe von exogenen GDNF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 4	69
Abbildung 16	Der Effekt der Zugabe von exogenen GDNF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 10	70

Abbildung 17	Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von exogenen GDNF an den Kulturtagen 4, 8 und 10	71
Abbildung 18	Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6 8 und 10	73
Abbildung 19	Temporale Expression der Zapfen-Opsine und GAPDH mRNA-Expression an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10	74
Abbildung 20	Der Effekt der Zugabe von exogenen PEDF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 8	77
Abbildung 21	Der Effekt der Zugabe von exogenen PEDF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 10	78
Abbildung 22	Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von PEDF an den Kulturtagen 4, 8 und 10	79
Abbildung 23	Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6 8 und 10	81
Abbildung 24	Temporale Expression der einzelnen Opsine und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6 8 und 10	83
Abbildung 25	Densitometrische Quantifizierung der Zapfen-Opsine und GAPDH mRNA-Expression in unbehandelten und PEDF-behandelten Sphäroiden	84
Abbildung 26	Der Effekt der Zugabe von exogenen BDNF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 8	87
Abbildung 27	Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von exogenen BDNF	88
Abbildung 28	Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin, der Zapfen-Opsine und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10	89
Abbildung 29	Der Effekt der Zugabe von exogenen GDNF und BDNF in Kombination auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 10	92
Abbildung 30	Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von GDNF und BDNF in Kombination an den Kulturtagen 8 und 10	93
Abbildung 31	Der Effekt der exogenen Zugabe von GDNF und PEDF in Kombination auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 10	95
Abbildung 32	Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von GDNF und PEDF in Kombination an den Kulturtagen 8 und 10	96
Abbildung 33	Nachweis der Pax6-positiven Zellen in Rosettensphäroiden des Kulturtages 6	98
Abbildung 34	Quantifizierung der Pax6-positiven Zellen in unbehandelten und behandelten Rosettensphäroiden der Kulturtage 4, 6, 8 und 10	99
Abbildung 35	Nachweis der AChE-Aktivität in Rosettensphäroiden des Kulturtages 10	100

Abbildung 36	Temporale Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10	102
Abbildung 37	Proteinexpression von Tyrosinhydroxylase (TH) in Rosettensphäroiden kultiviert unter Serum-reduzierten Bedingungen und nach der exogenen Zugabe von GDNF an den Kulturtagen 6, 8 und 10	104
Abbildung 39	Rosettensphäroide des Kulturtages 11 (48 h post Transfektion) transfiziert mit pCMS-EGFP-Expressionsvektor	106
Abbildung 40	Größenverhältnisse der transfizierten und untransfizierten Rosettensphäroide in mm ² an den Kulturtagen 5 und 7 (48 h post Transfektion)	107
Abbildung 41	Temporale Expression von endogenen GDNF und GAPDH in transfizierten Rosettensphäroiden an den Kulturtagen 5, 7, 9, 11 und 13 (48 h post Transfektion)	109
Abbildung 42	Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 5, 7, 9, 11 und 13 (48 h post Transfektion)	111
Abbildung 43	Der Effekt der Unterdrückung von endogenen GDNF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren	113
Abbildung 44	Der Effekt der Unterdrückung von endogenen GDNF auf Islet-1 positive Zellen	116
Abbildung 45	Temporale Expression von GAPDH und Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA in transfizierten Rosettensphäroiden an den Kulturtagen 5, 7, 9 und 11 (48 h post Transfektion)	118

DISKUSSION

Abbildung 46	Zelldegeneration von Photorezeptoren, welche Retinitis Pigmentosa zugrunde liegt, könnte durch den Einfluss von neurotrophen Faktoren aufgehalten werden	124
Abbildung 47	Mögliche Mechanismen, welche zum Überleben von Photorezeptoren führen, gefördert oder gehemmt durch neurotrophe Faktoren	131
Abbildung 48	Mögliche Mechanismen, ausgelöst durch GDNF und PEDF, auf die Ausbildung und Erhaltung von Müllerzellen im Rosettensphäroidsystem	135
Abbildung 49	Indirekter Signalmechanismus von GDNF über die Aktivierung von Müllerzellen	143

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Wachstumsfaktoren	33
Tabelle 2	Eingesetzte Erstantikörper mit verwendeten Verdünnungen und Inkubationszeiten	38
Tabelle 3	Eingesetzte Zweitantikörper mit verwendeten Verdünnungen und Inkubationszeiten	38
Tabelle 4	Zusammensetzung des Trenngels für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	41
Tabelle 5	Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	41
Tabelle 6	Annealingtemperatur- und -dauer für spezifische Primer der jeweiligen Gene	46
Tabelle 7	Die Effekte von GDNF, PEDF und BDNF für die Retinogenese <i>in vitro</i>	146

1 EINLEITUNG

Das Gehirn ist in seiner ganzen Komplexität ein viel erforschtes und begehrtes Gebiet der Wissenschaft. Das Zusammenwirken von Entwicklungsbiologie, Molekularbiologie, Genetik und nicht zuletzt der Medizin, hat eine Vielfältigkeit neuer Erkenntnisse über Strukturen und Funktionalität des Nervensystems hervorgebracht. Doch trotz großer Erfolge in den letzten Jahren bleiben viele Aspekte der Neuroentwicklung weiterhin unverstanden. Ein großer Antrieb bleiben zahlreiche degenerative Krankheiten des Nervensystems und die Hoffnung, aus neu gewonnenen Erkenntnissen bessere Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Um die Strukturen dieses vielschichtigen Netzwerkes aus Nervenzellen besser verstehen zu können, bedient man sich unterschiedlichster Modellsysteme, die den Zugang zum Nervensystem erleichtern. Die mit Hilfe dieser Modellsysteme gewonnenen Erkenntnisse, lassen dann Rückschlüsse auf das komplexere Nervensystem zu.

1.1 Die Hühnerretina als Modellsystem

Die Retina des Huhns stellt ein solches Modellsystem dar, welches die Erforschung, insbesondere von Entwicklungsprozessen, vereinfacht. Im Vergleich zum Gehirn ist die Retina weit weniger komplex. Es werden jedoch alle wichtigen entwicklungsbiologisch relevanten Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Schichtenbildung und Apoptose durchlebt. Aufgrund der exponierten Lage des Auges, stellt die Retina ein leicht zugängliches und manipulierbares System dar. Die Augen der Vögel entwickeln sich bereits sehr früh und nehmen im Vergleich zu anderen Strukturen sehr schnell an Größe zu. Die Embryonen sind mit einfachen Mitteln zu bebrüten und zu jedem Zeitpunkt der überschaubaren Embryonalentwicklung im Ei leicht zugänglich. Somit bietet das Huhn ideale Voraussetzungen als Modellsystem für die Erforschung der Prozesse der Retinogenese.

1.1.1 Die Entwicklung der Retina verläuft in klaren Mustern

Etwa 30 Stunden nach Befruchtung beginnt die Ausbildung des visuellen Systems. Noch bevor das Neuralrohr vollständig geschlossen ist, beginnt die Entwicklung durch seitliche Ausstülpungen im Bereich des späteren Diencephalons (Mey und Thanos, 2000). Diese bilden Flüssigkeit-gefüllte Vesikel, die Augenbläschen. Durch Invagination dieser Augenbläschen entstehen die zweiblättrigen Augenbecher. Die Zellen des inneren Blattes entwickeln sich später zur eigentlichen Retina, während die Zellen des äußeren Blattes das retinale Pigmentepithel (RPE) bilden. Die Retina ist damit ontogenetisch ein Teil des Gehirns. Die mehrschichtige Struktur der Retina geht aus einem einschichtigen Neuroepithel hervor, aus dessen Stammzellen sich alle neuronalen und glialen Zelltypen differenzieren. Die Zellen der zukünftigen Retina durchlaufen die Phasen der Proliferation, Migration und Differenzierung, wodurch ein mehrschichtiges Neuroepithel entsteht.

Während der retinalen Entwicklung zeichnet sich ein zentral-peripherer Differenzierungsgradient ab. Zentral gelegene Zellen sind dabei in ihrer Entwicklung am weitesten vorangeschritten. Die verschiedenen Zelltypen der Retina entstehen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten aus multipotenten Vorläuferzellen. Die ersten Zellen, die den Zellzyklus verlassen sind die Ganglienzellen. Es folgen die Photorezeptoren, sowie die Horizontal- und die Amakrinzellen. Die letzten Zellen, die den Zellzyklus verlassen sind die Bipolar- und Müllerzellen (Fischer und Reh, 2000). Die letzte Teilungsaktivität findet an Embryonaltag 12 statt (Prada et al., 1991; Mey und Thanos, 2000). Nachdem die noch „unreifen“ Zellen den Zellzyklus verlassen haben, erfolgt ihre allmähliche Spezifikation bzw. Differenzierung zu funktionsfähigen Retinazellen. Die Entwicklung und ihr weiteres Überleben hängen von einer Reihe verschiedener Faktoren ab, zu denen unter anderem auch Wachstumsfaktoren, auch so genannte neurotrophe Faktoren, gehören. Aber auch die Apoptose spielt während der Entwicklung eine entscheidende Rolle, um ein korrektes Verhältnis der unterschiedlichen Zelltypen zueinander zu erreichen. So gehen etwa 50% der Ganglien-, Amakrin- und Bipolarzellen in den programmierten Zelltod, wogegen nur 5% der Photorezeptoren im Laufe der Retinogenese sterben (Cepko et al., 1996).

1.1.2 Der Aufbau der Retina

Die Retina besteht aus zwei plexiformen und drei nukleären Schichten, die sich wiederum aus den spezifischen Zelltypen und deren Fortsätzen zusammensetzen. Von der skleralen zur vitrealen Seite zeichnet sich die Retina durch folgenden charakteristischen Aufbau aus:

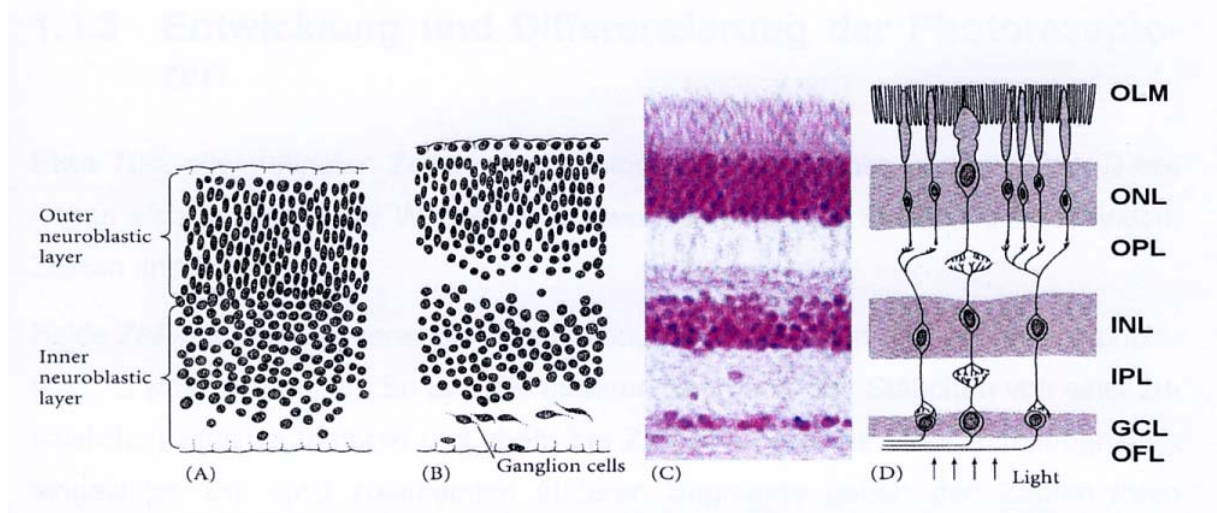


Abbildung 1: Aufbau und Entwicklung der Retinaschichten. A und B zeigen den Beginn der Schichtenbildung aus dem Neuroblastenepithel heraus. C und D stellen die Schichten einer adulten Retina in einem Gewebeschnitt bzw. schematisch dar. Deutlich zeichnen sich die nukleären Schichten von den plexiformen Schichten innerhalb der Retina ab. Quelle: Gilbert, Developmental Biology, 6th Edition.

Ausgehend von dem Pigmentepithel, welches die Retina nach außen hin abschirmt, wird die Retina durch die äußere limitierende Membran (OLM, *outer limiting membrane*) begrenzt. Durch diese ragen die äußeren Segmente der Photorezeptoren. In der darauf folgenden äußeren nukleären Schicht (ONL, *outer nuclear layer*) befinden sich die Zellkörper der Photorezeptoren. Auf die ONL folgt die äußere plexiforme Schicht (OPL, *outer plexiform layer*) mit Fasern und Synapsen der Photorezeptoren, sowie der Bipolar- und Horizontalzellen. Die Zellkörper der Horizontal-, Bipolar-, Amakrin- und Müllerzellen liegen in der inneren nukleären Schicht (INL, *inner nuclear layer*). Die Fasern und Synapsen der Amakrin-, Bipolar- und Ganglienzellen befinden sich in der inneren plexiformen Schicht (IPL, *inner plexiform layer*). Die nach innen an die IPL angrenzende Schicht ist die Ganglienzellschicht (GCL, *ganglion cell layer*), die aus Zellkörpern der Ganglienzellen geformt wird. Die letzte retinale Schicht ist die optische Faserschicht (OFL, *optic fibre layer*),

bestehend aus den Axonen der Ganglienzellen. Diese bilden letztendlich die Fasern des Sehnervs. Neben dieser klaren Anordnung innerhalb der Schichten gibt es auch so genannte *displaced cells*. Solche finden sich als *displaced* Amakrinzellen in der GCL und auch als *displaced* Ganglienzellen in der INL wieder. Die Fortsätze der Müllerzellen durchspannen die Retina radial und bilden sowohl die OLM im Bereich der Photorezeptoren, als auch die innere limitierende Membran (ILM, *inner limiting membrane*), welche die Retina nach innen gegen den Glaskörper abgrenzt.

1.2 Retinale Zelltypen und ihre Spezifikationen

1.2.1 Photorezeptoren sind die lichtempfindlichen Sehzellen in der Retina

Die Photorezeptoren sind die eigentlichen lichtempfindlichen Zellen der Retina. Es sind hochpolare Zellen, welche aus einem Außensegment, einem Innensegment, dem Zellkörper und einem Axon mit einer spezialisierten Synapse am Ende bestehen. Man unterscheidet zwischen zwei Typen: Stäbchen, die auf das Sehen bei schwacher Beleuchtung spezialisiert sind (skotopisches Sehen) und Zapfen, verantwortlich für das Farbsehen (phototopisches Sehen). Vögel sind Tetrachromaten. Sie besitzen im Gegensatz zum Menschen, der nur drei verschiedene Zapfentypen (rot-, blau-, grün-sensitive Zapfen) besitzt, fünf Zapfenarten, welche aber durch vier unterschiedliche Absorptionsmaxima charakterisiert werden: Neben rot-, blau- und grün-sensitiven Zapfen existiert in der Vogelretina noch ein violett-sensitiver Zapfentyp. Die verschiedenen Zapfentypen werden durch Öltröpfchen, welche im inneren Segment liegen, charakterisiert (Szèl und Röhlich, 1985; Kawata et al., 1992; Rothermel, 2000). Rot-sensitive Zapfen haben ein rotes Öltröpfchen, grün-sensitive eine gelbes, blau-sensitive ein farbloses und die für Vögel typischen violett-sensitiven Zapfen werden durch ein blass-blaues Öltröpfchen charakterisiert. Zusätzlich konnte im Huhn ein weiterer Zapfentyp nachgewiesen werden, die so genannten *double cones*, welche durch ein blass-grünes Öltröpfchen charakterisiert werden und rot-sensitiv sind.

1.2.2 Dopaminerge Amakrinzellen in der Retina

Zu den zwischengeschalteten Zellen oder Interneuronen, welche die erzeugten Impulse einer ersten Verarbeitung innerhalb der Retina unterziehen, gehören die Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen. Dopaminerge Neurone in der Hühnerretina repräsentieren eine sehr kleine Subpopulation von Amakrinzellen. Lediglich 1% aller Amakrinzellen ist dopaminerg (Oyster et al., 1985). Ab dem Embryonaltag 12 können dopaminerge Zellen mittels immunhistochemischer Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) in der inneren Seite der INL identifiziert werden (Araki et al., 1983; Kagami et al., 1991; Rohrer and Stell, 1995; Dos Santos and Gardino, 1998). Die dopaminergen Amakrinzellen zeichnen sich durch einen sehr großen Zellkörper und einer für sie typischen Morphologie, sowie weit ausgedehnten Fortsätzen aus. Die Neuriten erstrecken sich im Verlauf der embryonalen Entwicklung zum einem lateral direkt an der Grenze zwischen INL und IPL (der IPL-Subbande 1), zum anderen projizieren sie tief in die IPL hinein und verteilen sich dort horizontal in den Subbanden 3 und 4 (Dos Santos und Gardino, 1998). In der Hühnerretina existieren zwei Typen von dopaminergen Amakrinzellen, charakterisiert aufgrund der topographischen Verteilung und der Innervierung der Subbanden der IPL (Versaux-Botteri et al., 1986; Wang et al., 1990; Dos Santos und Gardino, 1998). Die häufiger beschriebenen TH-positiven Zellen gehören zum Typ 1 (Gardino et al., 1993).

1.2.3 Müllerzellen sind die Glia der Retina

In der Vergangenheit wurde den Müller-Gliazellen eine rein passive mechanische Stützfunktion für die Retina zugeschrieben. Forschungen der letzten 20 Jahren haben jedoch gezeigt, dass Müllerzellen sich aktiv an der neuronalen Informationsverarbeitung in der gesunden Retina beteiligen. Die Müllerzellen vermitteln Stoffwechsel-Interaktionen von Synapsen und Blutgefäßen. Müllerzellen üben zahlreiche, für das Überleben und für die Informationsverarbeitung der retinalen Neurone essentielle Funktionen aus: Zu nennen ist die Kaliumionen- und Wasserhomöostase, das Recycling von Transmittern, dem Radikal-Stoffwechsel und die Freisetzung von neurotrophen Faktoren. Pathologisch aktivierte Müllerzellen tragen somit entscheidend zum Verlauf von Netzhauterkrankungen bei. Müllerzellen

sind beteiligt an der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke bei Netzhauterkrankungen, und regulieren die retinale Neovaskularisierung mit.

In Zukunft könnten Müllerzellen große Bedeutung bei der Gentherapie von Netzhauterkrankungen erlangen, da sie, im Gegensatz zu Neuronen, diverse pathologische Umstände überleben können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Müllerzellen sich als eine Quelle für proliferierende Vorläufer-ähnliche Zellen in der postnatalen Hühnerretina präsentieren, und somit neuronale Regeneration versprechen (Fischer und Reh, 2001).

1.3. Neurotransmitter als Zellmarker

Das menschliche Gehirn besteht aus etwa 10^{12} Nervenzellen, von der jede einzelne wiederum mit 10^4 bis 10^5 anderen Neuronen in Kommunikation steht (Kandel et al., 1991). Die Signalweiterleitung erfolgt an den Kontaktstellen der Neurone, den Synapsen. Einlaufende elektrische Signale werden über Freisetzung von Neurotransmittern an der präsynaptischen Membran in chemische Signale umgewandelt. Die freigesetzten Neurotransmitter binden an der postsynaptischen Membran der Zielzelle an spezifische Rezeptoren. Die Reaktion, die von einem Neurotransmitter an einer Synapse hervorgerufen wird, kann erregend oder hemmend sein. Erregende und hemmende Neurotransmitter binden an verschiedene Rezeptoren, die sich aufgrund unterschiedlicher Ionenkanäle unterscheiden.

Da im Gehirn, und somit auch in der Retina, verschiedene Neurotransmitter vorkommen, können Neurone neben ihrer Lage im Gewebeverband und ihrer Morphologie, auch durch den von ihnen verwendeten Neurotransmitter charakterisiert werden.

1.3.1 Monaminerge Neurotransmitter in der Retina

Zu den monaminergen Neurotransmittern im Gehirn zählen die Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin) und Indolamine (Serotonin). Dopamin und die anderen Katecholamine werden in Nervenendigungen und in der Nebenniere ausgehend von Tyrosin synthetisiert.

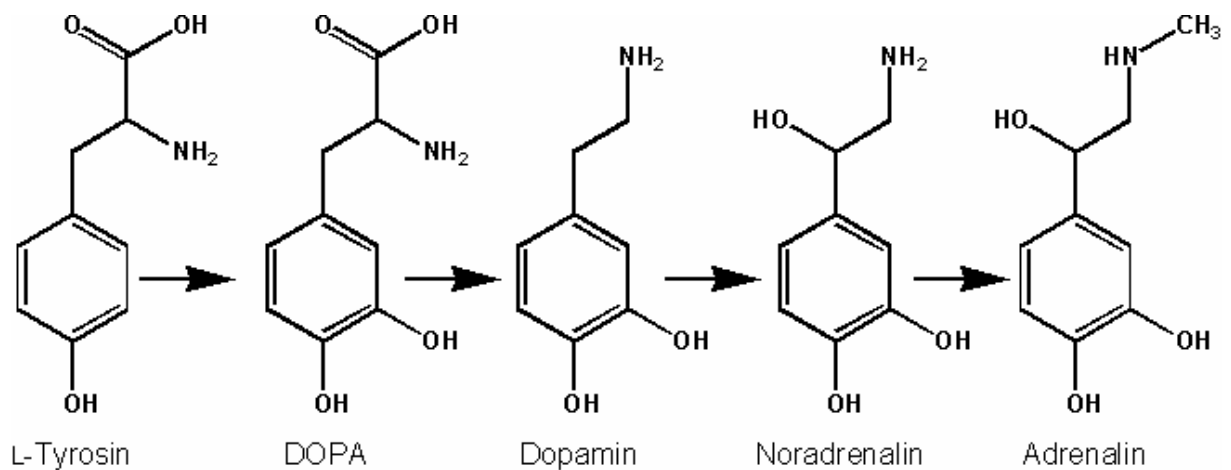


Abbildung 2. Biosynthese der Katecholamine. Tyrosin wird durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) zu DOPA hydroxyliert, welches im Anschluss zu Dopamin decarboxyliert wird. In den folgenden Schritten werden aus Dopamin die anderen Katecholamine, Noradrenalin und Adrenalin, synthetisiert. Quelle: www.wikipedia.org

Bei dieser Synthese ist der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt die Hydroxylierung des Tyrosins zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) (Nagatsu et al., 1964). Im nächsten Schritt erfolgt mittels einer Decarboxylase die Decarboxylierung von DOPA zu Dopamin. Aus Dopamin kann dann in darauf folgenden Schritten Noradrenalin und Adrenalin synthetisiert werden.

Bei immunhistochemischen Untersuchungen kann das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) als Marker für katecholaminerge Neuronen verwendet werden. Mittels dieser Methode konnten diese TH-positiven Zellen in Retinae von verschiedensten Vertebraten detektiert werden (Versaux-Botteri et al., 1984; Oyster et al., 1985; Ehniger et al., 1982; Hokoc und Mariani, 1988). Im Gehirn können TH-positive Zellen dopaminerg, adrenerg oder noradrenerg sein. Anders präsentiert sich die Situation in der Retina: TH-positive Zellen wurden ausschließlich als dopaminerg klassifiziert (Oyster et al., 1985; Wulle und Schnitzer, 1989; Kagami et al., 1991; Dos Santos und Gardino, 1998). Über die physiologische Funktion der dopaminergen Amakrinzellen ist bisher nur wenig bekannt. Es gibt einige Hinweise dafür, dass Dopamin als ein Vermittler für die Hemmung der Synthese von Melatonin bei Tageslicht fungiert (Zawilska et al., 2003). Andere Beobachtungen sprechen Dopamin eine antiapoptotische Rolle für embryonales retinales Gewebe zu (Varella et al., 1999).

1.3.2 Das cholinerge System in der Retina

Acetylcholin wurde als erster Neurotransmitter in den 20er Jahren des vergangenen Jahrhunderts entdeckt. Im menschlichen Nervensystem bedienen sich 10-15% der Neurone des Acetylcholin als Neurotransmitter. Acetylcholin wird zur Repolarisation der postsynaptischen Membran durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) in Acetat und Cholin gespalten (Massoulie und Bon, 1982). Die AChE ist phylogenetisch aus der weniger spezifisch wirkenden Butyrylcholinesterase (BChE), einer Serumcholinesterase, die jedoch auch im Gehirn vorkommt, hervorgegangen.

Cholinesterasen sind hoch aktive Enzyme, welche Acetylcholin hydrolysieren und damit die Acetylcholin-Aktivität an der postsynaptischen Membran beenden können. Neben dieser klassischen Funktion während der synaptischen Transmission gibt es besonders im Huhn zahlreiche Hinweise auf wichtige Schlüsselrollen der Cholinesterasen während der Entwicklung. Lange bevor Synaptogenese im Neuralrohr einsetzt, werden die verwandten Enzyme AChE und BChE in einer sich gegenseitig ausschließenden Weise exprimiert. Im Gehirn und im Auge des Huhns ist die Expression beider Enzyme koreguliert (Layer, 1983). Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen BChE und Proliferation von Zellen sowie zwischen AChE und Differenzierung von Zellen. Die Beteiligung der beiden Cholinesterasen an der Regulation dieser zellulären Prozesse wird durch zahlreiche Studien belegt (Layer und Sporns, 1987; Layer und Willbold, 1995). Neben weiteren Funktionen, unter anderem der Beteiligung bei Adhäsionsfunktionen, kann demnach eine AChE-Aktivität als Marker für differenzierende Zellen angesehen werden, und eine BChE-Aktivität als Proliferationsmarker (Layer et al., 1987). Darüber hinaus sind Cholinesterasen wichtig bei der Formation der Rhombomeren des Hinterhirns im Huhn (Layer und Willbold, 1994). Schließlich wurde mehrfach gezeigt, dass Cholinesterasen in der Pathologie von diversen degenerativen Krankheiten beteiligt sind.

1.4 Neurotrophe Faktoren als Vermittler entwicklungsbiologischer Prozesse

Die Entwicklung verschiedener Neuronenpopulationen hängt von diversen Faktoren ab. Einerseits spielen extrinsische Signale, die von der zellulären Umgebung ("*microenvironment*") abgegeben werden, eine große Rolle. Andererseits wird das Entwicklungspotential von der *cell-lineage*, d.h. von intrinsischen Faktoren, diktiert (Turner und Cepko, 1987; Holt et al., 1988; Wetts und Fraser, 1988). Zu den extrinsischen Faktoren werden unter anderen auch neurotrophe Faktoren gezählt. Diese, auch als Wachstumsfaktoren und Zytokine bezeichneten Proteine, sind von elementarer Bedeutung für die Entwicklung und Erhaltung des gesunden Nervensystems. Im adulten Nervensystem fallen neurotrophen Faktoren besondere Bedeutungen bei der Erhaltung von bestehenden Nervenstrukturen zu. Jedoch größer ist ihr Einfluss auf die Entwicklung: Neben Proliferation, Differenzierung und Überleben beeinflussen neurotrophe Faktoren das Auswachsen von Axonen, sowie die Modulation und Stabilisierung von Synapsen (Ogilvie et al., 2000). Neurotrophe Faktoren wirken als Signalmoleküle, die von der Zelle sezerniert werden und an der Zielzelle an spezifische Rezeptoren binden. Die Antwort auf die Signalweiterleitung hängt dabei vom Typ des Rezeptors und dem Status der Zelle ab (Ibanez, 1998).

Neurotrophe Faktoren zeigen großes Potential bei der Behandlung von degenerativen Krankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems (Thoenen, 1991; Zhang et al., 1997; Saarma und Sariola, 1999; Siegel und Chauhan, 2000; Bohn, 2000). Degenerierende Neurone in der Retina resultieren zu verschiedenen Pathologien, wie z.B. zugrunde gehende Photorezeptoren bei Retinitis Pigmentosa (RD). Vor allem in RD-Modellen konnte mehrfach gezeigt werden, welche Effekte die Verwendung von neurotrophen Faktoren auf degenerierende Zellen hat. (Faktorovich et al., 1990, 1992; Steinberg, 1994). Erste Experimente wurden durchgeführt, in denen rekombinante Faktoren in den Glaskörper von Ratten und Mäusen mit retinaler Degeneration injiziert wurden. Die Resultate zeigten, dass der *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) die Degeneration von Photorezeptoren in Ratten aufhält, und dass das Injizieren von mehreren Faktoren wie FGF-2, *fibroblast growth factor-1* (FGF-1) und *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) den durch Licht-induzierten Tod von Photorezeptoren zu verlangsamen vermag.

Als potente Quelle für neurotrophe Faktoren in der Retina kommen zum einen die direkte Umgebung, in der sich Vorläuferzellen entwickeln, und zum anderen der Retina benachbarte Gewebe wie das RPE in Frage (Layer et al., 1997; Rothermel et al., 1997; Rothermel und Layer, 2001). Die löslichen Moleküle können zwischen den sich entwickelnden Photorezeptoren oder anderen retinalen Zelltypen diffundieren und somit Entwicklungsschicksal bzw. Differenzierung dieser Zellen direkt beeinflussen (Watanabe und Raff, 1992). Zu diesen Molekülen gehören z.B. der *insulin growth factor I* (IGF I) und FGF-2, welche besonders für die Neuronendifferenzierung wichtig sind (Frade et al., 1996a; Frade et al., 1996b, Pittack et al., 1997). *Neuregulin-1* und FGF-1 sind für die Differenzierung retinaler Ganglienzellen von großer Bedeutung, während FGF-2 und CNTF eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Photorezeptoren spielen (Hicks und Courtois, 1992; Ezzeddine et al., 1997; Levine et al., 1997; Levine et al., 2000). Während die Bedeutung dieser neurotrophen Faktoren für die entwickelnde Retina weitestgehend geklärt ist, sind die Funktionen anderer Faktoren während der Retinogenese noch nicht bis ins Detail erforscht. Zu diesen Faktoren gehören unter anderen der *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und vor allem der noch weitgehend unbekannte *pigment epithelium derived factor* (PEDF).

1.4.1 Der *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF)

Der *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) ist ein entferntes Mitglied der *transforming growth factor* (TGF)- β *superfamily*. Die Familie der GDNF *family ligands* (GFLs) umfasst noch drei weitere, bisher bekannten Mitglieder: *neurturin* (NRTN), *artemin* (ARTN) und *persephin* (PSPN). Entdeckt wurde GDNF aufgrund seiner Fähigkeit, das Überleben von embryonalen dopaminergen Neuronen in Kultur zu unterstützen (Lin et al., 1993). Neben den dopaminergen Neuronen im ventralen Mittelhirn fördert GDNF die Entwicklung und das Überleben von spinalen Motoneuronen und nigralen noradrenergen Neuronen (Buj-Bello., 1995; Li et al., 1995). Des Weiteren fungiert GDNF auch als wichtiger Überlebensfaktor für eine Vielfalt von Neuronen des peripheren Nervensystems, wie sensorische Neuronen, Neurone des autonomen Nervensystems (insbesondere sympathische Neurone) und Neurone des Darmnervensystems (Buj-Bello., 1995; Hearn et al., 1998; Heuckeroth

et al., 1998; Enomoto et al., 2000; Young et al., 2001). Darüber hinaus ist GDNF involviert in die Entwicklung von nicht-neuronalen Geweben wie der Niere (als Signalmolekül für das Auswachsen der Ureterknospe), des respiratorischen Systems, sowie von Haut, Knochen und Muskeln (Nosrat et al., 1996; Golden et al., 1999). GDNF zieht immer mehr Aufmerksamkeit aufgrund des hohen therapeutischen Potentials bei der Behandlung degenerativer Krankheiten wie Parkinson, Alzheimer und Hirschsprung auf sich (Lapchack et al., 1997; Baranyay et al., 2000; Bordeaux et al., 2000; Siegel und Chauhan, 2000).

Die Liganden der GDNF-Familie binden über ein Rezeptorsystem, bestehend aus zwei Komponenten: Die stark affinen Liganden-bindenden Untereinheiten der GFR α s (GDNF-*family receptor* α) und der Signal-weiterleitenden Rezeptor Tyrosin Kinase (cRET) (Buj-Bello et al., 1995; Trupp et al., 1995; Jing et al., 1997; Baloh et al., 2000). Die GFR α s sind über einen Glykosyl Phosphatidylinositol Anker (GPI) mit der Zelloberfläche verbunden. Bisher war eine Bindung von cRET an die GFR α s für ein vollständig funktionierendes Rezeptorsystem unabdingbar. Die Tatsache, dass verschiedene Studien auch nicht-überlappende Expressionsmuster für cRET und GFR α s aufzeigen, verspricht zumindest für GDNF und NRTN eine mögliche cRET-unabhängige Signalweiterleitung (Trupp et al., 1999; Sariola und Saarma et al., 2003).

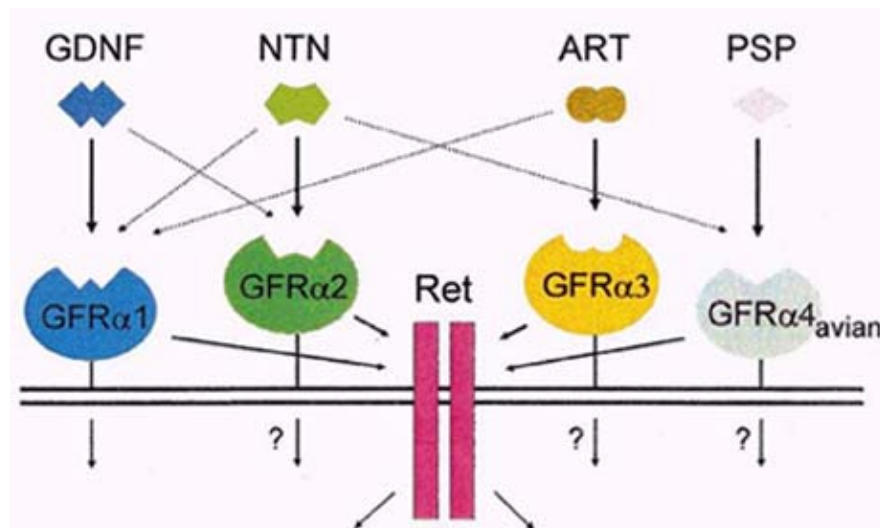


Abbildung 3. Crosstalk zwischen den einzelnen Liganden und Rezeptoren. GFR α 1 kann neben GDNF, sowohl NTN als auch ART binden, während GFR α 2 nur GDNF und NTN zu binden vermag. ART ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der einzige Ligand für GFR α 3, während GFR α 4_{Huhn} neben PSP

auch NTN binden kann. GDNF kann c-Ret-unabhängig über GFR α 1 transduzieren. (nach Sanicola et al., 1997).

Ist cRET über eine Ligandenbindung durch die GFLs phosphoryliert, aktiviert diese verschiedene Signalwege ins Zellinnere, bei der weitere Kinasen-Signalwege beteiligt sind, wie der Ras/Mitogen-aktivierte Kinase (MAPK)-Signalweg (Worby et al., 1996) oder auch Signalwege, die von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) abhängig sind (Besset et al., 2000). Die Kinasen der src-Familie spielen eine entscheidende Rolle bei der cRET-unabhängigen Signalweiterleitung (Trupp et al., 1999).

Trotz des gesteigerten Interesses, in der Erforschung des Einflusses auf das zentrale Nervensystem, ist nach wie vor nur wenig hinreichend bekannt, welche Bedeutung GDNF der embryonalen Retina zukommt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass GDNF das Überleben von Photorezeptoren, insbesondere der Stäbchen, während der Entwicklung fördert und den Zelltod hinauszögern kann (Koeberle und Ball, 1998; Frasson et al., 1999; Politi et al., 2001; Rothermel und Layer, 2003). Der Verlust der Photorezeptoren durch Zelltod ist das Ereignis, welches der Pathologie von Retinitis Pigmentosa zu Grunde liegt. Der über GDNF ausgeübte Effekt auf die Photorezeptoren scheint nicht direkt vermittelt, sondern über Interaktion mit den Müllerzellen ausgeübt zu werden. Neben den Photorezeptoren zeigt GDNF neurotrophes Potential als Überlebensfaktor für Ganglienzellen (Koeberle und Ball, 1998, 2002; Klocker et al., 1997; Yan et al., 1999). Die beschriebenen Effekte auf Ganglienzellen ähneln dabei denen von BDNF (siehe Gliederungspunkt 1.4.3).

Neuere Hinweise unterstützen die bedeutende Rolle der GDNF-Familie für die Entwicklung der Retina: In diesem Sinne muss vor allem der Rezeptoruntereinheit GFR α 4 eine große Bedeutung zugesprochen werden. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass GFR α 4 in allen retinalen Zellschichten exprimiert wird. Unter anderem auch in einer Subpopulation der Photorezeptoren (Volpert, 2002; Rothermel et al., 2004) und in Zellen des neuroepithelialen Gewebes der *ciliary margin zone* (CMZ: ziliare Randzone), ein Ort, in dem retinale Stammzellen identifiziert wurden (Fischer und Reh, 2000). Darüber hinaus entspricht die Expression dem allgemeinen zentral-peripheren Differenzierungsgradienten der Retina, sowie den jeweiligen Differenzierungspunkten der einzelnen Zelltypen (Volpert, 2002; Rothermel et al.,

2004). Weitere Beweise zeigten sich nach dem Gen-*Knock-down* von GFR α 4 in retinalen Sphäroidkulturen. Neben Amakrinzellen und Horizontalzellen sind vor allem die blau-sensitiven Zapfen durch den Gen-*Knock-down* betroffen. Die Ergebnisse deuten auf einen regulierenden Effekt von GFR α 4 während der Proliferation und Differenzierung von früh geborenen Zelltypen der Retina hin und zeigen eine wichtige Bedeutung von GFR α 4 bei der Determination von blau- und grün-sensitiven Zapfen (Rothermel et al., 2006). Schließlich bleibt zu klären, welcher der Liganden der GFLs über GFR α 4 entsprechende Effekte in der Retina ausübt und ob wirklich *persephin* jener Ligand ist, dem eine erhöhte Bedeutung in der Retina zugesprochen werden muss.

Zusammenfassend zeigt sich GDNF als einer der potentesten neurotrophen Faktoren, für neuronales, sowie nicht-neuronales Gewebe, und als wertvolles Werkzeug für die Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson und Retinitis Pigmentosa.

1.4.2 Der *pigment epithelium-derived factor* (PEDF)

Während der Retinogenese entwickelt sich das innere Blatt des Augenbechers zur neuralen Retina, das äußere Blatt formt im Gegenzug das Retinale Pigment Epithel (RPE). Eine dichte Nachbarschaft beider Gewebe wird nicht nur durch die gemeinsame Entwicklung charakterisiert, sondern auch durch deren Funktionalität. Die Interaktionen zwischen Retina und RPE sind fundamental für die funktionelle und strukturelle Differenzierung von Photorezeptoren (Hollyfield und Witkovsky, 1974). Vor allem die Entwicklung der äußeren Segmente wird reguliert durch das RPE. Wird das RPE entfernt, ist die Differenzierung der Photorezeptoren stark beeinflusst (Jablonski et al., 2000). Grund für diese Abhängigkeit zwischen Retina und RPE sind, neben dem Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten, zahlreiche Signalmoleküle, welche aus dem RPE sekretiert werden (Steele et al., 1993). Viele dieser Faktoren konnten erfolgreich identifiziert werden: Der *photoreceptor survival-promoting factor* (PSPA; Hewitt et al., 1990) und zahlreiche, andere sehr bekannten und gut untersuchten Faktoren wie der *platelet derived growth factor* (PDGF; Campochiaro et al., 1989), der *fibroblast growth factor* (FGF; Plouet und Gospodarowicz, 1989), der *transforming growth factor- α* (TGF- α ; Fassio et al., 1989)

und der *transforming growth factor-β* (TGF-β; Connor et al., 1989) werden vom RPE synthetisiert.

In den letzten Jahren hat sich ein weiterer, äußerst potenter Faktor identifizieren lassen: Der *pigment epithelium-derived factor* (PEDF). PEDF wurde isoliert aus konditioniertem Medium von menschlichen RPE-Zellen. PEDF hat die Fähigkeit, neuronale Differenzierung in kultivierten Retinoblastoma Zellen zu induzieren (Tombran-Tink und Johnson, 1989; Tombran-Tink et al., 1991). PEDF ist ein 50 kDA großes Glykoprotein und gehört zu einer Gruppe der *serine protease inhibitory* (Serpin) Supergenfamilie, deren Mitglieder sich untereinander strukturell stark ähneln, und wichtige Funktionen während zahlreicher zellulärer Prozesse ausüben (Carrell et al., 1985; Steele et al., 1993; Xu et al., 2006). Trotz einer inhibitorischen Aktivitätsseite, konnte für PEDF bisher kein inhibitorischer Effekt auf Proteasen nachgewiesen werden (Becerra et al., 1995). Seit seiner Entdeckung im RPE, ist PEDF auch in anderen Geweben des Auges und des zentralen Nervensystems identifiziert worden (Ortego et al., 1996; Tombran-Tink et al., 1996). Viele Studien zeigen die physiologische Funktion von PEDF in einer Vielzahl von Geweben: PEDF agiert als Überlebensfaktor für kultivierte zerebrale Granulazellen (Araki et al., 1998), spinale Motoneurone (Bilak et al., 1999) und Neuronen des Hippocampus (DeCoster et al., 1999).

Die Bedeutung von PEDF für die neuronale Retina ist bisher nicht ganz geklärt. Jüngste Hinweise zeigen eine Schutzfunktion für Müller- und Ganglienzellen vor dem Zelltod (Li et al., 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass Müllerzellen sowie auch Ganglienzellen PEDF selbst exprimieren und auch sekretieren (Behling et al., 2002; Eichler et al., 2004).

Aufgrund seiner Herkunft aus dem RPE, beschäftigen sich zahlreiche Studien mit der Rolle von PEDF für die Photorezeptoren. Eine Expression von PEDF in den Photorezeptoren konnte bisher nur für den Menschen nachgewiesen werden (Behling et al., 2002). Aber ein neurotropher Effekt von PEDF für Photorezeptoren *in vitro* wurde mehrfach bewiesen. PEDF, sekretiert vom RPE, ist fähig Photorezeptoren vor dem Zelltod zu schützen, welcher durch Licht, oxidativen Stress und Glutamat-induzierte Toxizität ausgelöst wird (Jablonski et al., 2000; Cao et al., 2001, Imai et al., 2005).

PEDF zeigt neben diesen neurotrophen und neuroprotektiven Eigenschaften auch ein sehr großes Potential als antiangiogener Faktor während der Neovaskularisierung von Blutgefäßen (Tombran-Tink und Barnstable, 2003a,b). Diese antiangiogenen Eigenschaften sind speziell im Auge, embryonal wie im adulten Stadium, gut untersucht (Dawson et al., 1999; Behling et al., 2002). Der antiangiogene Effekt von PEDF ist deshalb interessant, seit bekannt ist, dass PEDF vor allem in Blutgefäßen vorkommt, welche bei der Pathogenese von neovaskulären Augenkrankheiten (CNV, choroidale Neovaskularisierung) neu gebildet werden (Ogata et al., 2002). Zu geringes Vorhandensein von PEDF spielt eine entscheidende Rolle beim Voranschreiten dieser neovaskulären Krankheiten, welche unter anderen zur Altersbedingten Makuladegeneration (AMD) führen, einer der Hauptgründe für Blindheit in der westlichen Welt (Lewis et al., 1990). Dabei steht PEDF im Wechselspiel mit dem prominenten proangiogenen Faktor der Blutgefäßentwicklung, dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Pierce et al., 1995). Grund für die Pathologie neovaskulärer Krankheiten ist ein gestörtes Gleichgewicht zwischen VEGF und PEDF (Apte et al., 2004; Tong und Yao, 2006). Der antiangiogene Effekt von PEDF ist zusätzlich sehr spezifisch: Während neovaskuläre Gefäße in ihrer Entwicklung gehemmt werden, bleibt die Entwicklung normaler Gefäße durch PEDF unbeeinflusst (Dawson et al., 1999; Wong et al., 2004). All diese Erkenntnisse lassen in PEDF großes Potential für Therapie-Möglichkeiten bei der Behandlung von neovaskulären Augenkrankheiten vermuten.

Doch PEDF verspricht noch viel mehr: Neovaskularisierung, sowie bei der CNV beschrieben, ist im adulten Stadium meist verbunden mit Pathologien, wie z.B. Tumorwachstum oder Diabetes. Basierend auf seinen antiangiogenen, antiproliferierenden und prodifferenzierenden Eigenschaften sowie neu entdeckten direkten Antitumor-Effekten, welche bei der Induktion der Differenzierung oder der Apoptose der Tumorzellen involviert sind, wird PEDF auch ein großes Antitumorpotential zugesprochen (Fernandez-Garcia et al., 2007; Ek et al., 2006a,b).

Verschiedene Studien haben sich mit der Frage nach der Existenz PEDF-spezifischer Rezeptoren beschäftigt. Die Gruppen um Aymerich und Alberdi zeigen Hinweise, dass in der Retina mehrere spezifische PEDF Rezeptoren vorkommen (Aymerich et al., 2001; Alberdi et al., 1999). Der gut untersuchte neurotrophe Effekt

auf Neurone und der antiangiogene Effekt auf neu gebildete Blutgefäße lassen für PEDF ein Zwei-Rezeptorsystem annehmen. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass die beschriebenen Effekte von PEDF über separate Regionen des Moleküls ausgeübt werden (Chader et al., 2001).

Zusammenfassend präsentiert PEDF sich als ein wertvolles Werkzeug bei der Behandlung von vielen neurodegenerativen Krankheiten, welche vor allem mit einem abnormalen Wachstum von Blutgefäßen im Auge und auch bei metastatischem Krebs in vielen anderen Geweben, verbunden sind. (Tombran-Tink, 2005).

1.4.3 Der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)

Die Familie der Neurotrophine, mit ihren Mitgliedern *nerve growth factor* (NGF) *neurotrophine-3* (NT-3), *neurotrophine-4/5* (NT-4/5) und *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) ist eine der am intensivsten untersuchten Gruppen von neurotrophen Faktoren. Ähnlich wie die GDNF-Familie, binden Neurotrophine über ein Zwei-Komponenten-Rezeptorsystem, bestehend aus der Liganden-spezifischen Rezeptor Tyrosin Kinase A, B oder C (TrkA, TrkB, TrkC; Barbacid, 1994; Kafitz et al., 1999) und der unspezifischen Untereinheit p57, welche alle Neurotrophine gleich stark bindet (Rodriguez-Tèbar et al., 1990). Die Bindung von BDNF an seine spezifische Rezeptoruntereinheit TrkB aktiviert eine *downstream* gelegene Ras/Mitogen-aktivierte Protein Kinase und den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signalweg, der neuronales Überleben einleitet (Takkei et al., 1998; Kaplan und Miller, 2000). BDNF hat eine zentrale Rolle bei der Regulation des Überlebens einer Vielzahl von neuronalen Zellpopulationen, wie z.B. Motoneurone (Becker et al., 1998; Kaplan und Miller, 2000).

Eine besonders wichtige Aufgabe wird BDNF in der Retina zugesprochen: Bestimmte Zelltypen der Retina werden durch den neurotrophen Effekt von BDNF gefördert. Der Faktor selbst wird im Colliculus superior bzw. optischem Tectum produziert, und retrograd über den Sehnerv, bestehend aus den Axonen der Ganglienzellen, in die Retina transportiert (von Bartheld et al., 1996). Die Ganglienzellen der Retina exprimieren verstärkt den BDNF-spezifischen Rezeptor TrkB (Garner et al., 1996; Hallbook et al., 1996). So konnte mehrfach gezeigt

werden, dass BDNF das Überleben von Ganglienzellen, embryonal, sowie auch im adulten Stadium, fördert (Watanabe et al., 1997) und sie vor dem Absterben, z.B. nach einer Verletzung oder Entfernung des Sehnervs, retten kann (Johnson et al., 1986; Rogriguez-Tèbar et al, 1989; Mey und Thanos, 1993; Mansour-Robaey et al., 1994; Zhang et al., 2005). Diese Erkenntnisse zeigen BDNF als ein wertvolles Werkzeug für Therapiemöglichkeiten bei der Behandlung von Glaukoma, einer der häufigsten Gründe für Blindheit in der westlichen Welt (Quigley, 1999). Glaukoma entsteht durch den Verlust von Ganglienzellen, als Folge intraokularen Drucks (IOP; Gramer et al., 1996).

Ein weiterer Hinweis auf die bedeutende Rolle von BDNF für die Retina, ist der Nachweis des Rezeptors in anderen retinalen Schichten: Amakrinzellen in der INL zeigen hohe Vorkommen an TrkB (Hallbook et al., 1996; Kido et al, 2000, Cusato et al, 2002), vor allem jene Zellen, welche dopaminerg sind (Cellerino und Kohler, 1997). Es konnte vielfach gezeigt werden, dass BDNF das dopaminerge System, insbesondere in der Retina, zu modulieren bedarf (Cellerino et al., 1998). Diese Erkenntnis ist besonders wichtig für die Behandlung einer weiteren neurogenerativen Krankheit der Retina, der diabetischen Retinopathie, bei der Veränderungen im dopaminergen System erste Ereignisse in der Entwicklung der Krankheit darstellen (Northington et al., 1985; Lieth et al., 2000). Diese Veränderungen machen sich vor allem in der Dichte der dopaminergen Zellen bemerkbar (Seki et al., 2005). Ist der Sehnerv entfernt, kann kein BDNF mehr in die dopaminergen Zellen transportiert werden und die Strukturen des Netzwerkes aus dopaminergen Zellen gehen verloren (Lee et al., 2005). Ein weiterer Zelltyp der INL, die Müllerzellen, produziert und sekretiert ebenfalls BDNF. Neuere Studien zeigen Müllerzellen als eine endogene BDNF-Quelle für die Retina (Seki et al., 2005).

BDNF beeinflusst zusätzlich Entwicklung und Funktion der Photorezeptoren (Rickman und Bowes Rickman, 1996; Rohrer et al., 1999): Nach Licht-induzierter Zelldegeneration und nach einer Netzhautablösung vermag BDNF den Zelltod von Photorezeptoren hinauszuzögern (LaVail et al., 1992; Okoye et al., 2003; Lewis et al., 1999). Wird darüber hinaus BDNF intraokular injiziert, erscheinen die äußeren Segmente der Stäbchen länger ausgebildet und mehr organisiert (Lewis et al., 1999). Inzwischen sprechen zudem neueste Studien dem BDNF/TrkB-System eine entscheidende Rolle bei Determination von retinalen Vorläuferzellen zu Photorezeptoren zu (Turner et al., 2006).

Neurotrophine wurden zunächst als reine neurotrophe Faktoren angesehen, die das Überleben von Neuronenpopulation fördern und das Neuritenwachstum stimulieren können. Inzwischen gibt es zahlreiche Hinweise für einen Einfluss auf weitere neuronale Ereignisse wie Proliferation, Transmittersynthese, synaptische Transmission (Stoop und Poo, 1999; Levine et al., 1995) und vor allem auf die Ausbildung von Plastizität und Organisation der Synapsen (Thoenen, 1995; McAllister et al., 1999; Neal et al., 2003). In diesem Zusammenhang werden vor allem Eigenschaften des cholinergen Systems durch BDNF moduliert. Insbesondere die Fähigkeit, die AChE-Freisetzung zu fördern, unterstreicht die vermittelnde Rolle von BDNF während der synaptischen Transmission (Slonimsky et al., 2003). Überdies hinaus übt BDNF auch sein neurotrophes Potential auf das cholinerge System aus, indem er das Überleben von embryonalen und postnatalen, reifenden cholinergen Neuronen nach einer Verletzung fördert (Hashimoto et al., 1999; Ward und Hagg, 2000). BDNF ist ein essentieller Überlebensfaktor für die cholinergen Neurone, die vor allem im späten Stadium der Alzheimerschen Krankheit degenerieren. Dies macht BDNF zu einem äußerst potenten Werkzeug bei der Behandlung von dieser in der ganzen Welt sehr häufig auftretenden neurodegenerativen Krankheit.

1.5 Embryonale Retinazellen im dreidimensionalen Zellkultursystem

Zellkultursysteme bieten viele Möglichkeiten, die Entwicklung von Zellen über ein weites Spektrum manipulieren zu können, z.B. durch die Zugabe diverser Faktoren. Dadurch ist es möglich, den Einfluss von Faktoren auf unterschiedliche Entwicklungsprozesse genauestens zu untersuchen. Durch Verwendung verschiedener Kultursysteme, welche unterschiedliche Gewebeeigenschaften charakterisieren, kann die Entwicklung von bestimmten Zelltypen, z.B. von Photorezeptoren, in Abhängigkeit von der zellulären Umgebung (*microenvironment*) untersucht werden. Jedoch muss ungeachtet aller Vorteile immer berücksichtigt werden, dass Zellen in Kultur sich nicht in ihrer natürlichen Umgebung befinden. Da Entwicklungsprozesse häufig von Umgebungssignalen abhängig sind, spiegelt die Entwicklung *in vitro* somit nicht zwangsläufig die embryonale Entwicklung *in vivo* wieder.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Zellkultursystem angewendet, in dem sich embryonale Retinazellen in einer dreidimensionalen Organisation entwickeln. Dieses so genannte Rosettensphäroid-Kultursystem erreicht gegenüber zweidimensionalen Monolayer-Kultursystemen einen weitaus höheren Organisationsgrad (Vollmer et al., 1984; Layer und Willbold, 1989). Vereinzelte Retinazellen werden dabei während ihrer *in vitro*-Entwicklung über Rotation horizontal in Bewegung gehalten. Durch Zell-Zell-Erkennungs- und *sorting-out*-Prozesse entstehen erste Primäraggregate, mit abnehmenden Affinitätsgradienten vom Zentrum zur Peripherie hin (Trinkaus, 1963; Steinberg, 1970; Armstrong, 1989). Nach der Steinberg-Hypothese lagern sich dabei als erste die adhäsivsten Zellen zusammen. Im Falle der Rosettensphäroide sind das prospektive Photorezeptoren, die sich bereits eine Stunde nach Starten der Kultur zu Rosetten zusammenlagern und Hohlkugeln bilden, an deren Oberflächen sich weitere Zellen anlagern (BenShaul und Moscona, 1975). Durch Proliferation und Differenzierung wachsen dann die Rosettensphäroide heran. Hierbei werden alle typischen Retinazellen ausgebildet. Innerhalb der Rosettensphäroide kann unter organisierten und unorganisierten Bereichen unterschieden werden: Die organisierten Bereiche, so genannte Rosetten, zeichnen sich durch kreisförmig angeordnete Photorezeptoren aus, und sind von einer OPL und einer teilweise ausgebildeten INL umgeben. Die Anordnung der Schichten ist hierbei gegenüber der *in vivo*-Retina invers. Die übrigen Bereiche der Rosettensphäroide sind unorganisiert und werden durch diffus verteilte Retinazellen gebildet, innerhalb derer es zu organisierten Bereichen mit einer stärkeren Ansammlung von IPL-Fasern kommt (IPL-Bereiche). In den übrigen unorganisierten Bereichen sind Zellen und ihre Fortsätze meist eher zufällig angeordnet (Rothermel und Layer, 2001).

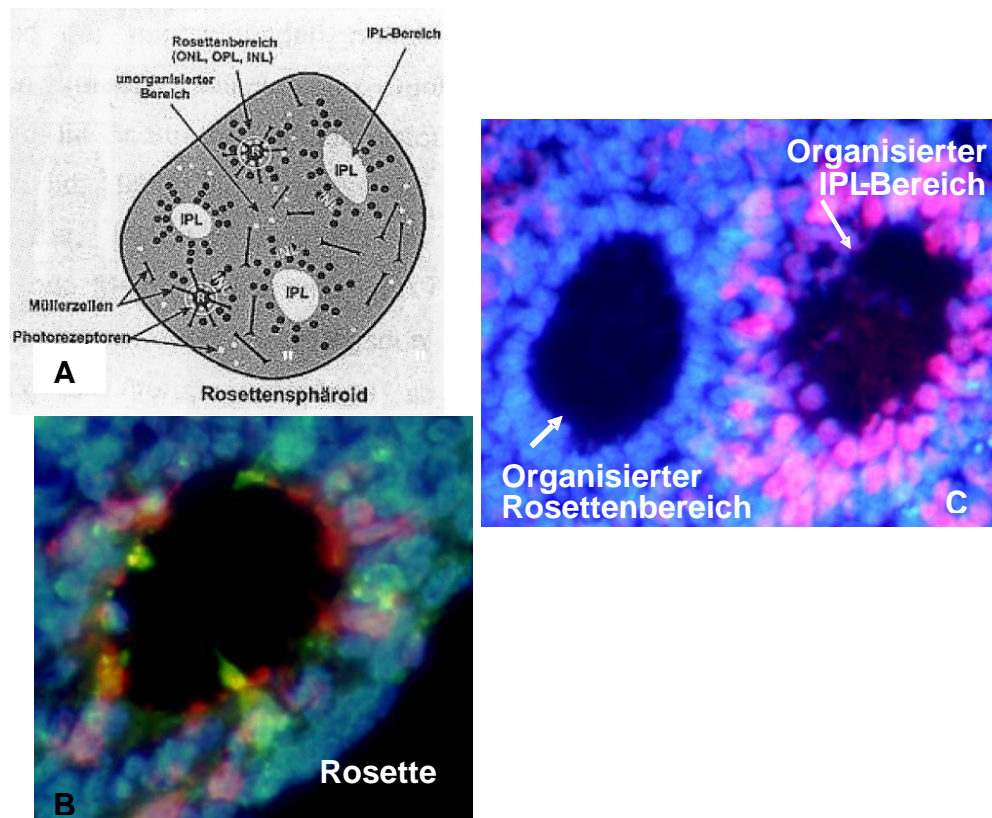


Abbildung 4. Das dreidimensionale Rosettensphäroids-System als Repräsentant für eine Retina *in vitro*. **A:** Schematische Zeichnung der Rosettensphäroidstruktur mit den organisierten Rosetten und IPL-Bereichen und unorganisierten Bereichen. **B:** Antikörperfärbung einer Rosette. Markiert sind Stäbchen (rot) und Zapfen (grün) sowie die Zellkerne (blau). Die Rosetten zeichnen sich durch eine inverse Retinaschichtung aus, in der die Photorezeptoren nach innen in das Zell- und Faserfreie Lumen orientiert sind. **C:** Färbung eines Rosettenbereichs direkt benachbart zu einem IPL-Bereich. Die Zellkerne sind blau markiert. Mittels des Antikörpers Pax6 (rot) können Zellen der INL, vornehmlich Amakrinzellen, detektiert werden. Die IPL-Bereiche werden aus Fasern und Synapsen der Zellen der INL gebildet. Im Innern der IPL-Bereiche können einzelne *displaced* Ganglienzellen identifiziert werden.

2 ZIELSETZUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Zytokine bzw. neurotrophen Faktoren GDNF, BDNF und PEDF auf die Retinogenese *in vitro* untersucht werden. Als Modellsystem diene das so genannte Rosettensphäroidsystem, ein dreidimensionales Kultursystem, durch das die Erforschung entwicklungsbiologischer Vorgänge, in diesem Falle für retinale Zellen des Hühnerembryos, vereinfacht wird. Die retinalen Zellen durchlaufen in diesem Kultursystem alle entwicklungsbiologisch relevanten Prozesse wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose.

Im ersten Teil der Arbeit war das Ziel gesetzt, mögliche Einflüsse, ausgelöst durch GDNF, BDNF und PEDF, für die sich entwickelnden retinalen Zellen mittels so genannter *gain-of-function*-Experimenten zu ergründen. Dafür sollten Rosettensphäroide unter Minimalbedingungen kultiviert werden, d.h. unter der Zugabe von lediglich 2% Serum, um mögliche äußeren Einflüsse zu minimieren. Darüber hinaus sollten Kulturen in Anwesenheit der Faktoren GDNF, BDNF und PEDF, jeder für sich alleine, aber auch in Kombination, über einen Zeitraum von 10 Tagen kultiviert werden. Die Analyse der grundlegenden Prozesse Proliferation und Apoptose sollte einen ersten Einblick in die Wirkung von Neurotrophen Faktoren für retinale Zellen geben. Spezialisierte Effekte für Photorezeptoren und auch für diverse Populationen von Amakrinzellen sollten auf immunhistochemischer Ebene, sowie auf der Ebene der Gen- und Proteinexpression untersucht werden. Zusätzlich sollte ein Augenmerk auf die Organisation der Rosettensphäroidsstruktur gelegt werden und der Einfluss von GDNF, BDNF und PEDF auf diese untersucht werden.

Der zweite Teil der Arbeit setzt den Schwerpunkt auf den Einfluss von GDNF, der, wie schon mehrfach gezeigt, ein äußerst weiträumiges Spektrum an Funktionen für entwickelnde Neurone ausübt. Detaillierte Einblicke in diese Funktionen während der Retinogenese sollten mittels so genannter *loss-of-function*-Experimente gewonnen werden. Dafür sollten rekombinante Plasmidvektoren geschaffen werden, die eine Sequenz mit sich tragen, die der Originalsequenz von GDNF *in vivo* in gegensätzlicher Orientierung (*antisense*) vorliegt. Über diese GDNF-*Antisense*-Sequenz, ligiert in einen Expressionsvektor, sollte die Möglichkeit geschaffen

werden, die Expression von endogenen GDNF zu unterdrücken. Welche Effekte dieser *Gen-Knock-down* für die sich entwickelnden Zelltypen der Retina *in vitro* haben würden, sollte wiederum auf der immunhistochemischen, sowie auch auf der Ebene der Genexpression geklärt werden.

Mit diesen Studien sollte versucht werden, einen tieferen Einblick in die Komplexität der Wirkung von neurotrophen Faktoren zu gewinnen, insbesondere von GDNF, BDNF und PEDF während der Retinogenese *in vitro*.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien

Bezugsquelle

Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose	Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Darmstadt
Bis-Acrylamid	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma, Deisenhofen
Casein	Tropix, USA
DAPI	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma, Deisenhofen
dNTP-Mix	Promega, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Entwickler GBX	Eastman Kodak, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fixierer GBX	Eastman Kodak, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	ICN Biomedicals, USA
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt

KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Lämmli-Puffer	Bio Rad, München
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaAcetat	Merck, Darmstadt
NaCitrat	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
10x Polymerase-Puffer	Promega, Mannheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Triton	Merck, Darmstadt

3.1.2 Aggregationsmedium und –zusätze

DMEM	Gibco, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein
Gentamycin	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
L-Glutamin	Seromed, Berlin
F12-Medium	Gibco, Eggenstein
GDNF	Chemicon, Great Britain

3.1.2.1 Zusammensetzung der Medien und Pufferlösungen

Minimalmedium

DMEM
2% FCS
1% L-Glutamin
0,1% Penicillin/Streptomycin
0,02 mg/ml Gentamycin

10x PBS

80 g NaCl (1,37 M)
2g KCL (27 mM)
11,5 g Na₂HPO₄ (83 mM)
2 g KH₂PO₄ (15 mM)
ad 1 L H₂O dest., pH 6,8

1x PBS

50 ml 10x PBS
450 ml H₂O dest.

PBSTx

50 ml 1x PBS
50 µl Triton X-100

Blocklösung

0,2 g BSA
0,1% Triton X-100
ad 20 ml 1x PBS

25% Saccharose-Lösung

25 g Saccharose
100 ml 1x PBS

4% Paraformaldehyd

4g PFA
in 80 ml 1x PBS mit 10M NaOH
lösen, auf pH 11 bringen,
mit 37% HCL auf pH 7,3,

	ad 100 ml 1x PBS
LB-Medium	8 g Casein 8 g NaCl 4 g Hefeextrakt ad 800 ml H ₂ O dest. pH 7,5 NaOH
LB-Platten	15 g Agar in LB-Medium, autoklavieren, auf 50 °C temperieren und auf 50 µg/ml Kanamycin einstellen
50 x TAE-Puffer	242 g Tris 57 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 L H ₂ O dest.
Homogenisationspuffer	1 mM NaHCO ₃ 0,2 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 0,2 mM CaCl ₂ x H ₂ O 1 mM Spermidin in DEPC-H ₂ O, pH 8,0
3.1.3 Antikörper	
Rho4D2	David Hicks, Frankreich
Cern906	Willem DeGrip, Niederlande
Tyrosin Hydroxylase	Chemicon, GB
Pax6	Developmental Studies Hybridoma Bank, USA
PCNA	Chemicon, GB

Glutaminsynthetase	BD Bioscience
Cy2 goat-anti-rabbit	Dianova, Hamburg
Cy3 rabbit-anti-mouse	Dianova, Hamburg
Cy3 donkey-anti-mouse	Dianova, Hamburg

3.1.4 Enzyme

Desoxyribonuklease	Worthington Biochemical Corp., USA
Ribonuklease	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen: <i>Eco</i> RI	New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs
Trypsin	Worthington Biochemical Corp., USA

3.1.5 Primer

GDNF	Primer <i>sense</i>	5` TGC CAG AGG ATT ACC CAG AT 3`
	Primer <i>antisense</i>	5` AGG TCA TCG TCA AAG GCT GT 3`
GAPDH	Primer <i>sense</i>	5` GGA CAG TTC AAG GGC ACT GT 3`
	Primer <i>antisense</i>	5` CTT CTG TGT GGC TGT GAT GG 3`
Tyrosin Hydroxylase	Primer <i>sense</i>	5` AGC CTG TAT CCA ACC CAT 3`
	Primer <i>antisense</i>	5` GCT TTG ACT ATC CCA TTC TGT 3`
Rhodopsin	Primer <i>sense</i>	5` TCC TTC ACA GTG CAG ACC AG 3`
	Primer <i>antisense</i>	5` ACT CCG GAC GCC TCT AAA CT 3`
Opsin violett	Primer <i>sense</i>	5` TAC TCG CTG CGG TAT TTC GT 3`
	Primer <i>antisense</i>	5` CGT GGG CCT TCT ACC TAC AG 3`

Opsin rot	Primer _{sense}	5` CAG AAG CAG TAG GCC ACG AT 3`
	Primer _{antisense}	5` ATC AAC CAG ATC TCG GGG TA 3`
Opsin blau	Primer _{sense}	5` AGC TCC GTT CCC ACC TTA AT 3`
	Primer _{antisense}	5` CGC TCT GAG TGT GAT GAG GA 3`
Opsin grün	Primer _{sense}	5` CAT GAT GGG CAT AGC TTT CA 3`
	Primer _{antisense}	5` TGG TGA TCA TGC AAT TAC GG 3`

3.1.6 Reaktionsansätze

In-vitro-Transkription

DIG RNA Labeling Kit

(*SP6/T7*), Roche, Mannheim

In-situ-Zelltod-Detektion (*Tunel*)

In situ cell death detektion kit,

Boehringer, Mannheim

RNA-Isolierung

RNeasy-Kit, Quiagen, Hilden

Mini-Plasmidpräparation

Wizards Plus SV minipreps

DNA Purification Systems,

Promega, Mannheim

Midi-Plasmidpräparation

Nucleobond AX Plasmid

Purification Kit, Machery-Nagel,

Düren

Reverse Transkription

ReverseTranscription Systems,

Promega, Mannheim

Klonierung

Original TA Cloning Kit,

Invitrogen, Karlsruhe

Western-Blot Detektion

ECL Western Blotting Detection

Reagent, Amersham,

Braunschweig

3.1.7 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α

One Shot Cells, Invitrogen,
Karlsruhe

3.1.8 Vektoren

pCR[®] II

Invitrogen, Karlsruhe

pCMS-EGFP

Clonotech, Palo Alto, USA

3.1.9 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

3 MM Whatman-Papier

Whatman, Maidstone

Deckgläser

Merck, Darmstadt

DNA-Molekulargewichtsmarker

Roth, Karlsruhe

Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,2, 0,5, 1,5 und 2 ml

Eppendorf, Hamburg

Fettstift (PAP-PEN)

SCI, München

Hybond Nitrocellulosemembran

Amersham, Braunschweig

Objektträger 76 x 26 mm (Superfrost)

Merck, Darmstadt

Polypropylenröhrchen 12 und 50 ml

Greiner, Frickenhausen

Parafilm

NeoLab, Heidelberg

3.1.10 Geräte

Analysenwaage

Sartorius, Göttingen

Axiophot mit Auflicht-Fluoreszenz

Carl Zeiss, Jena

Binokular Stemi SV11

Carl Zeiss, Jena

CO₂-Inkubator

Heraeus, Hanau

Densitometer GS-700

BioRad, München

Elektrophoreseapparatur 12 x 14 cm

Peqlab, Erlangen

Hybond Nitrocellulose

Amersham, Braunschweig

Kryostat HM 500OM	Microm, Walldorf
Magnetrührer	Itec, Staufeu
pH-Meter MP 220	Mettler, Toledo
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Schütteltisch	GFL, Burgwald
Schüttler für Rotationskulturen	Eigenbau des MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen
SemiDry-Blot Apparatur	Biotec Fischer, Frankfurt
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer UV/VIS	Perkin Elmer, Langen
Sterilbank HLB 2448	Heraeus, Hanau
Thermocycler	MWG, Ebersberg
UV-Transluminator	AGS, Heidelberg
Vakuumkonzentrator	Bachhofer, Reutlingen
Vortexgeräte	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Western-Blot-Apparatur	BioRad, München
Zentrifuge für Eppendorf-Reaktionsgefäße	Hermle, Wehingen

3.1.11 Filme

Röntgenfilme XAR-5	Eastman Kodak, USA
S/W-Film T Max 400	Eastman Kodak, USA
Polaroidfilme	Amersham, Braunschweig

3.1.12 Software

Diskus Histologie MAN F70B Ver.4.30.652-#377	Büro Hilgers, Königswinter
---	----------------------------

Multianalyst 2.0

Bio Rad, München

Microsoft Windows

Adobe Photoshop

3.1.13 Versuchstiere

Als Versuchsobjekte dienen Eier der Haushuhnrasse *White Leghorn* (*Gallus gallus domesticus*). Die befruchteten Eier werden über den Geflügelvermehrungsbetrieb LSL-Rhein-Main in Dieburg bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Lagerung und Bebrütung der Eier

Es werden befruchtete Eier der Haushuhnrasse *White Leghorn* verwendet. Bis zur Bebrütung werden die Eier bei 14 °C gelagert. Die Bebrütung der Eier erfolgt in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 85 %. Während der Bebrütung werden die Eier jede dritte Stunde gewendet. Je nach gewünschtem Entwicklungsstadium werden die Eier zur Präparation der Augen entnommen.

3.2.2 Präparation embryonaler Augen

Um mögliche Kontaminationen zu vermeiden, finden die nachfolgenden Präparationen unter sterilen Bedingungen statt. Vor der Entnahme des Embryos werden die Eier mit Alkohol desinfiziert. Mit einer abgerundeten Pinzette wird das Ei geöffnet, der Embryo dekaptiert und das Auge vom Kopf frei präpariert. Für die anschließende Herstellung von Rosettensphäroiden (siehe Gliederungspunkt 3.2.3), sowie für die Isolierung der Retinae (siehe Gliederungspunkt 3.2.13), werden die Augen in eisgekühltes F12-Medium überführt.

3.2.3 Herstellung von Rosettensphäroidkulturen

Ausgangsmaterial für die Kultivierung von Rosettensphäroiden bilden die zentralen Retinae von embryonalen Hühneraugen des Embryonaltages 6. Die in F12-Medium gesammelten Augen aus Gliederungspunkt 3.2.2 werden mit einer Mikroschere unter einem Binokular durch einen Schnitt in der Ora Serrata in einen zentralen und einen peripheren Teil getrennt. Die Präparation der Retina erfolgt in Kalzium-freiem HBSS. Nach dem Entfernen des Glaskörpers und der Linse wird die zentrale Retina aus dem Augenbecher herausgelöst und in F12-Medium gesammelt. Die gesammelten Retinae werden bei 800 x g für 5 min zentrifugiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird das Retinapellet in 2 ml Trypsin-Lösung (1 mg/ml) aufgeschüttelt und für 8 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 8 ml F12-Medium abgestoppt und erneut bei 800 x g für 5 min zentrifugiert. Durch Aufschütteln des Retinapellet in 10 ml F12-Medium werden letzte Reste von Trypsin

ausgewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 800 x g wird das Retinapellet mit 2 ml DNase1-Lösung (50 µg/ml) vermischt. Mit einer rund geschmolzenen und durch Schmelzen verengten Pasteurpipette werden die Retinazellen durch 15maliges Auf- und Abziehen vereinzelt. Daraufhin werden die Zellen in der DNase-Lösung für 12 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wird wieder mit 10 ml F12-Medium abgestoppt. Um freiwerdende DNA und DNase-Reste gründlich auszuwaschen, wird das Retinapellet drei- bis viermal mal in 10 ml F12-Medium gewaschen. Dabei erfolgen die Zentrifugationsschritte erneut bei 800 x g. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl Minimalmedium pro auszusäender Kulturschale aufgenommen und suspendiert.

3.2.3.1 Ansetzen der Rosettensphäroidkulturen

Um externe Einflüsse, bedingt durch zugegebenes Serum, zu minimieren, wird ein Aggregationsmedium mit 2% fetalen Kälberserum (Minimalmedium) verwendet. In Kulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm werden jeweils 1900 µl Minimalmedium vorgelegt. Für die Behandlung mit Wachstumsfaktoren werden die einzelnen Faktoren in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle 1) in das vorgelegte Minimalmedium gegeben. Die Kontrollkulturen enthalten ausschließlich das Minimalmedium.

GDNF	50 ng/ml
BDNF	10 ng/ml
PEDF	50 ng/ml
GDNF + BDNF	50 ng/ml + 10 ng/ml
GDNF + PEDF	50 ng/ml + 50 ng/ml

Tabelle 1. Eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Wachstumsfaktoren.

Pro Kulturschale wird die Retinamenge von 2 Augen ausgesät werden. D.h. 100 µl der Zellsuspension wird in die vorbereiteten Kulturschalen gegeben. Die angesetzten Kulturen werden in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre bebrütet und dabei auf einem Rotationsschüttler mit 75 U/min horizontal geschwenkt. Das Minimalmedium wird jeden zweiten Tag gewechselt, wobei in den behandelten

Rosettensphäroiden der entsprechende Wachstumsfaktor bei jedem Mediumwechsel erneut zugegeben wird.

3.2.4 Fixierung und Herstellung von Gefrierschnitten

3.2.4.1 Ernten und Fixieren von Rosettensphäroiden für Gefrierschnitte

Die in Gliederungspunkt 3.2.3 hergestellten Rosettensphäroide werden zu den jeweiligen Kulturtagen in Eppendorf-Reaktionsgefäße gesammelt und mit 1 x PBS zweimal für 10 min gewaschen. Die Fixierung der Rosettensphäroide erfolgt für 30 min in 4 %igen Paraformaldehyd bei RT. Darauf folgend werden die Rosettensphäroide dreimal mit 1 x PBS gewaschen, wobei sichergestellt werden sollte, dass jegliches Paraformaldehyd entfernt wird. Die gewaschenen Rosettensphäroide werden in 25 %iger Sucrose-Lösung aufgenommen und bei 4°C gelagert, bis sämtliche Flüssigkeit aus den Rosettensphäroiden ausgetreten ist und die Rosettensphäroide auf den Boden der Reaktionsgefäße gesunken sind.

3.2.4.2 Herstellung von Gefrierschnitten von Rosettensphäroiden

Sobald die in Gliederungspunkt 3.2.4.1 fixierten Rosettensphäroide in den Reaktionsgefäßen abgesunken sind, können von ihnen Gefrierschnitte angefertigt werden. Dazu werden die Rosettensphäroide mittels einer Pasteurpipette zu einem größeren Tropfen auf den Objektisch eines Kryostaten bei einer Objekttemperatur von – 29°C aufgefroren. Mit Hilfe des Kryostaten werden Schnitte von 10 –12 µm für Immunfärbungen angefertigt. Die Schnitte werden auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgenommen und bei – 20°C bzw. – 80°C aufbewahrt.

3.2.5 Ernten und Herstellung von Homogenaten

Für die Herstellung von Gewebhomogenaten werden Sphäroide des jeweiligen Kulturtages geerntet und 2 x 5 min mit 1x PBS gewaschen. Zu den gewaschenen Sphäroiden wird Homogenisationspuffer zugegeben und für 30 sec mit der Ultraschall-Sonde homogenisiert. Daraufhin folgt ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 12 000 rpm. Der Überstand wird abgezogen und für die spätere Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.6 Ernten von Rosettensphäroiden für RNA-Isolierung

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA werden die Rosettensphäroide zu den jeweiligen Kulturtagen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Rosettensphäroide werden zweimal mit DEPC-behandelten PBS bei 4°C gewaschen. Das PBS wird restlos abgesaugt und die Rosettensphäroide werden bei – 80°C gelagert.

3.2.7 Transfektion eukaryotischer Zellen (Kalziumphosphat-präzipitation)

Mittels der Transfektion ist es möglich, Fremd-DNA in eine Wirtszelle einzubringen, ohne diese zu schaden. Im Falle der Kalziumphosphat-präzipitationsmethode (Kriegler, 1991) handelt es sich um eine transiente Transfektion, bei der nur ein Teil der eingesetzten DNA in den Zellkern eindringt und das entsprechende Gen auch nur für wenige Tage exprimiert wird. Als Transfektionslösung dient ein Gemisch aus DNA, Kalziumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung. In der Transfektionslösung bilden sich DNA-Kalziumphosphat-Kristalle, die sich bei Kontakt mit der Wirtszelle auf deren Oberfläche niederschlagen. Die DNA gelangt daraufhin über Endocytose in die Wirtszelle.

Die zu transfizierenden Rosettensphäroide werden unter Minimalbedingungen kultiviert. Am Tag der Transfektion dient ein Mediumwechsel als Waschschrift, wobei die zu transfizierenden Kulturschalen nur mit 1,5 ml Minimalmedium befüllt werden. Pro zu transfizierende Kulturschale werden 10 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Der Transfektionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

10 µg Plasmid-DNA
150 µl 2 x HBS-Puffer
15 µl 2,5M CaCl₂
X µl TE-Puffer

In eine Kavität wird 2 x HBS-Puffer vorgelegt. In eine weitere Kavität wird die Plasmid-DNA mit der CaCl₂-Lösung vermischt und mit TE-Puffer auf ein Endvolumen

von 300 µl aufgefüllt. Unter leichtem Schwenken wird das DNA-CaCl₂-Gemisch tropfenweise in den vorgelegten 2 x HBS-Puffer gegeben. Durch Einleitung von Luft über Blasenbildung mittels einer Pasteurpipette wird ein Präzipitatskeim gesetzt. Die Präzipitatsbildung verläuft für 30 min bei RT. Der Transfektionsansatz wird zu den vorbereiteten Rosettensphäroiden gegeben und für 16 h zur Transfektion in den Kulturschalen belassen. Die Kulturen werden in dieser Zeit bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Transfektionszeit erfolgt ein Mediumwechsel mit Minimalmedium, welches bis zur Zellernte nach 48 h Posttransfektionszeit in den Kulturschalen verbleibt.

3.2.8 Immunhistochemische Färbungen von Rosettensphäroiden

Unter Anwendung spezifischer Antikörper ist es möglich spezifische Proteine in Geweben zu detektieren. Dank der hohen Spezifität in der Erkennung von Antigenen haben Antikörper eine hohe Bedeutung bei der Detektion von spezifischen Proteinen, sowie dem Sichtbarmachen der Verteilung der zu untersuchenden Proteine.

Hierbei handelt es sich um ein indirektes Nachweissystem, bei dem ein primärer Antikörper spezifisch an das Antigen in der Zielzelle bindet. Diese Bindung wird mittels eines sekundären Antikörpers, der wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reportersubstrat konjugiert ist, nachgewiesen. Eine Verstärkung des Detektionssignal wird dadurch erreicht, dass mehrere sekundäre Antikörper binden.

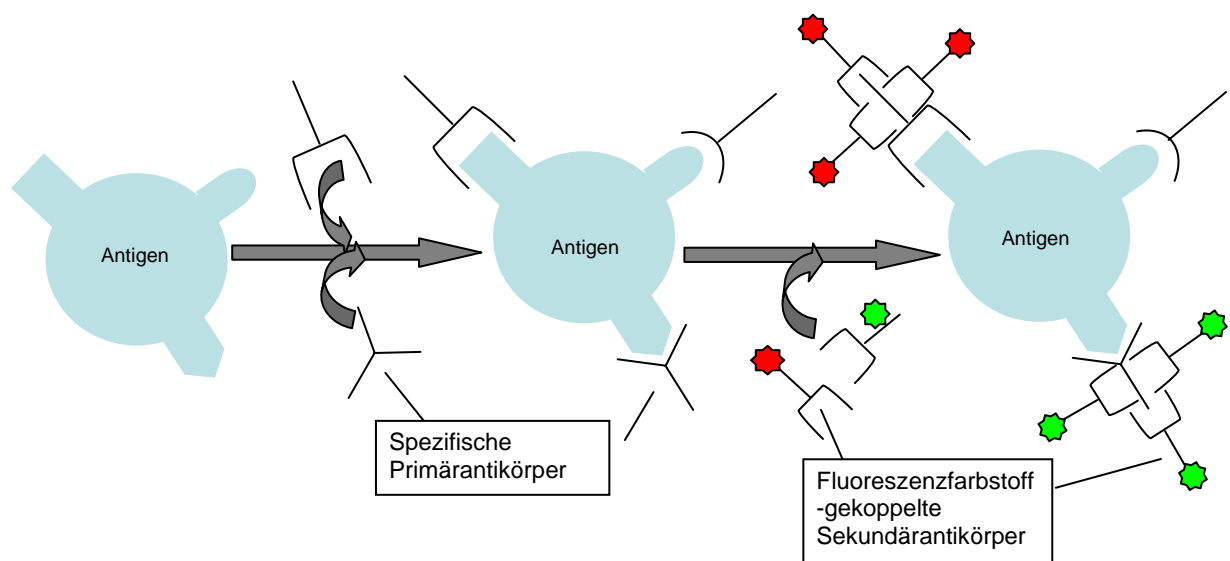


Abbildung 5. Schematische Darstellung einer Antikörperfärbung. Der spezifische Primärantikörper bindet an das Antigen der Zielzelle. Mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Sekundärantikörper binden an den spezifischen Primärantikörper.

3.2.8.1 Blockierung unspezifischer Bindestelle

Die bei – 20°C gelagerten Gefrierschnitte werden bei 37°C aufgetaut und getrocknet. Um das Abfließen von Flüssigkeiten zu verhindern, werden die Objektträger mit einem Fettstift umrandet. Nach dem Trocknen werden die Gefrierschnitte mit Rinderserumalbumin (BSA) geblockt, um unspezifische Bindestellen für den Antikörper zu besetzen und eine mögliche Hintergrundfärbung zu verhindern.

Für die Blockierung werden die Objektträger mit 500 µl 3 %iger Blocklösung (3% BSA, 1% Triton in PBS) beschichtet und für eine halbe bis eine Stunde bei RT inkubiert,

3.2.8.2 Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper

Für die Detektion werden monoklonale, sowie polyklonale Primärantikörper eingesetzt. Monoklonale Antikörper werden synthetisiert als eine Fusion aus Immun-B-Zellen mit bekannter Spezifität aus einer Tumorzelllinie. Dadurch erkennen monoklonale Antikörper nur ein einzelnes Epitop auf dem Antigen der Zielzelle, während polyklonale Antikörper gegen mehrere Epitope gerichtet sind.

Auf das Blockieren der unspezifischen Bindestellen folgt die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper. Dazu werden die Objektträger mit je 100 µl Antikörperlösung, in entsprechenden Konzentrationen in Blocklösung (siehe Tabelle 2) beschichtet. Die Dauer der Inkubation richtet sich nach den eingesetzten Primärantikörpern (siehe Tabelle 2) und beträgt 75 min bis 24 h.

Auf die Inkubation mit dem Primärantikörper folgen zwei Waschschriffe mit je 500 µl 1 X PBS für 10 min, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper gestartet werden kann. Der eingesetzte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3) richtet sich nach dem jeweiligen Primärantikörper und wird inkubiert für 1 Stunde. Um eine Abschwächung der Signalstärke zu verhindern, werden die Objektträger für die folgenden Schritte abgedunkelt. Es folgen zwei weitere Waschschriffe mit 1 x PBS

für jeweils 10 min. Mit DAPI werden die Zellkerne angefärbt. Dafür werden die Objektträger für 2 min mit DAPI-Lösung (0,1 µg/ml) überschichtet, bevor abschließend ein Waschschrift mit 1 x PBS folgt.

	Rho4D2	CERN 906	TH	Pax6	GS	Islet-1
Gerichtet gegen	Stäbchen	Zapfen	dopamin. Amakrinzellen	Amakrinzellen	Müllerzellen	Ganglien- und <i>displaced</i> Amakrinzellen
Spezifität	Mono-klonal	Poly-klonal	Mono-klonal	Konz. Überstand	Mono-klonal	Monoklonal
Herkunft	Maus	Kaninchen	Maus	Maus	Maus	Maus
Verdünnung in Blocklösung	1:1000	1:500	1:100	1:100	1:100	1:100
Dauer der Inkubation	75 min RT	75 min RT	Über Nacht 4°C	75 min RT	75 min RT	75 min RT
Sekundärantikörper	Cy3 d α m	Cy2 g α rb	Cy3 d α m	Cy3 rb α m	Cy3 d α m	Cy3 d α m

Tabelle 2. Eingesetzte Erstantikörper mit verwendeten Verdünnungen und Inkubationszeiten.

	Cy3 donkey-anti-mouse	Cy3 rabbit-anti-mouse	Cy2 goat-anti-rabbit
Spezifität	Cy3- gekoppeltes IG	Cy3- gekoppeltes IG	Cy2- gekoppeltes IG
Herkunft	Esel	Kaninchen	Ziege
Verdünnung in Blocklösung	1:100	1:100	1:50
Dauer der Inkubation	1 h RT	1 h RT	1 h RT

Tabelle 3. Eingesetzte Zweitantikörper mit verwendeten Verdünnungen und Inkubationszeiten.

3.2.8.3 Eindecken der Objektträger

Nach dem letzten Waschschrift mit 1 x PBS werden die Gefrierschnitte in dest. Wasser eingetaucht und bei 37°C getrocknet. Um die Präparate dauerhaft zu machen, werden die Objektträger mit Kaiser's Glycingelatine überschichtet und mit Deckgläsern bedeckt.

3.2.9 Proliferationsnachweis mittels einer PCNA-Färbung

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) fungiert als Kofaktor der DNA-Polymerase und ist in proliferierenden Zellen nachweisbar. Die Kryostatschnitte werden für mind. 30 min bei 37°C getrocknet. Darauf erfolgt eine Inkubation mit 4 N HCL für 10 min. Nach der Inkubation werden die Schnitte mit PBS dreimal für 10 min gewaschen. Nachdem die Schnitte erneut getrocknet sind, werden die Objektträger mit einem Fettstift umrandet. Es erfolgt die Blockierung unspezifischer Bindestellen mit einer 3%igen BSA-Blocklösung. Der Erstantikörper, der gegen PCNA gerichtet ist, wird in einer Verdünnung von 1:250 in Blocklösung eingesetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C. Vor der Reaktion mit dem Zweitantikörper folgen drei Waschschriffe mit PBS für jeweils 5 min. Als Zweitantikörper wird der Cy3 *donkey anti mouse* verwendet, mit dem die Schnitte für 75 min bei RT inkubiert werden. Abschließend folgen erneut drei Waschschriffe mit PBS, bevor die Schnitte getrocknet werden und schließlich in Kaiser`s Glycingelatine eingedeckt werden.

2.2.10 Zelltod-Detektion mit Hilfe des TUNEL-Assays

Für die Zelltod-Detektion wird der *In Situ Death Detection Kit* von Roche verwendet.

Mit Hilfe der TUNEL-Reaktion lassen sich DNA-Strangbrüche während der Apoptose markieren. Hierzu werden Kryostatschnitte in einer Permeabilisierungslösung für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Die Schnitte werden mit 50 µl terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (TUNEL-Reaktionsmischung) in 450 µl Markierungslösung (Nukleotod-Mischung) inkubiert. Dieser Schritt findet in einer Feuchtkammer bei 37°C für 60 min im Dunklen statt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellkerne für 3 min mit DAPI angefärbt. Nach dem die Schnitte getrocknet sind, können sie mit Kaiser`s Glycingelatine eingedeckt werden und im Dunkel aufbewahrt werden.

3.2.11 Karnovsky-Roots-Färbung

Mit Hilfe der Karnovsky-Roots-Färbung (Karnovsky und Roots, 1964) kann die AChE-Aktivität sichtbar gemacht werden. Die Anfärbung findet durch eine chemische

Umsetzung statt, bei welcher durch AChE Acetylthiocholinjodid in Acetat und Thiocholin gespalten wird. Das Thiocholin bildet mit seiner Schwefelgruppe und dem Kupfercyanoferat-Komplex einen braunen Niederschlag aus. Dieser Niederschlag ermöglicht eine Lokalisierung der AChE im Gewebe.

Für die Färbung werden Gefrierschnitte zunächst bei 37°C getrocknet. Danach werden die Schnitte mit Tris-Maleat-Puffer für 10 min äquilibriert. Daraufhin wird der Tris-Maleat-Puffer verworfen und die Färbelösung hinzu gegeben. Die Färbelösung setzt sich wie folgt zusammen:

01 M Na-Citrat
30 mM CuSO₄
5 mM K₃Fe(CN)₆
10⁻² M iso-Opma

Die Inkubation mit der Färbelösung erfolgt für ca. 1 h bei 37°C. Nach der Färbung folgen zwei Waschschrte mit H₂O dest. für 10 min. Anschließend werden die Zellkerne mit DAPI für 3 min angefärbt. Bevor die Schnitte mit Kaiser's Glycingelatine eingedeckt werden können, werden sie mit H₂O dest. gewaschen und bei 37°C getrocknet. Die Schnitte werden bei Dunkelheit und RT aufbewahrt.

3.2.12 Western-Blot-Anaylse

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse lassen sich bestimmte Proteine in einem Proteingemisch durch spezifische Antikörper analysieren.

3.2.12.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford lässt sich der Proteingehalt photometrisch messen. Hierbei steht die Proteinkonzentration in direkter Abhängigkeit zu der bei 595 nm gemessenen Absorption. Durch die Mitführung einer BSA-Eichkurve (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml BSA) wird die gemessene OD in Absolutwerte (Angabe in µg/ml) umgerechnet.

Von den Homogenaten der Rosettensphäroiden aus Gliederungspunkt 3.2.5 werden 1:50 Verdünnungen in H₂O erstellt. In Messküvetten werden 1 ml Bradfordlösung (0,01% Comassie Brilliant Blue G250, 4,7% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure) vorgelegt und mit den verdünnten Proben vermischt. Es folgt eine Inkubationszeit von 10 min. Die Konzentration der Proteine wird mit Hilfe der Eichreihe, des Absorptionswertes und der 1:50 Verdünnung bestimmt.

3.2.12.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden die Proteine aus den Proben aufgetrennt. Das Gel für die Auftrennung der Proteine besteht aus zwei Anteilen: einem 4,5%igen Sammelgel, in dem die Proteine einer Konzentration unterzogen werden, und dem eigentlichen Trenngel, dessen Acrylamidkonzentration abhängig von der Größe der aufzutrennenden Protein ist.

Trenngel

	10%
30% Bis-Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	3,3ml
1,5 M Tris HCl pH8,8	2,5ml
Aqua dest	4,2ml
10% SDS	100µl
10% APS (Ammoniumperoxid-Disulfat)	50µl
TEMED	5µl

Tabelle 4. Zusammensetzung des Trenngels für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Sammelgel

	4,5%
30% Bis-Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	0,65ml
0,5 M Tris HCl pH6,8	1,25ml
Aqua dest	3ml
10% SDS	50µl
10% APS (Ammoniumperoxid-Disulfat)	50µl
TEMED	5µl

Tabelle 5. Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zunächst wird das Trenngel in die Elektrophorese-Gelvorrichtung gegossen. Ist dieses polymerisiert, wird das Sammelgel obenauf gegossen. Mittels eines Kamms,

der in das Sammelgel eingeleitet wird, werden Taschen zum Auftragen der Proben geschaffen. Die Proben werden mit Probenpuffer (950µl *laemmli-sample-buffer* und 10 µl β-Mercaptoethanol) in einem Verhältnis 1:1 versetzt. Es folgt eine Inkubationszeit von 3 min bei 95°C. Mit einer Hamilton-Spritze werden die Proben in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei einer Spannung von 200V für 45 min.

3.2.12.3 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran

Im Folgenden werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran in einem Western Blot übertragen. Auf das Gel wird die in Transferpuffer prääquilibrierte Nitrocellulosemembran gelegt. Mit dem Gel nach unten wird das Gel mit der Membran auf einen Stapel von ebenfalls in Transferpuffer prääquilibrierten Whatman-papieren auf die Kathode der Semi-Trocken-Transferappatur gelegt. Auf die Membran werden ebenfalls Whatman-papiere gestapelt. Die Anode wird auf den Stapel gesetzt. Der Transfer erfolgt bei 150mA für 45 min. Nach dem Transfer werden Gel und Filterpapiere verworfen und die Nitrocellulosemembran einer Antikörperreaktion unterzogen.

3.2.12.4 Antikörperreaktion

Vor der eigentlichen Antikörperreaktion erfolgt das Blocken der unspezifischen Bindestellen mit 5%iger Blocklösung (1,5 g Magermilchpulver in 30 ml TBST). Danach erfolgen drei Waschschrte mit TBST für jeweils 5 min. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgt mit dem Antikörper Tyrosinhydroxylase 1:1000 in TBST verdünnt für mindestens 12 Stunden bei 4°C. Danach folgen wieder drei Waschschrte mit TBST, bevor die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgt. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper *Pox anti mouse* erfolgt in einer Verdünnung von 1:5000 in TBST für 1 1/2 Stunden.

3.2.12.5 Detektion

Die Detektion der Antikörperreaktion erfolgt mit dem *ECL Western Blotting Detection Reagent* von *Amersham*. Die Reagenzien A und B werden in einem

Verhältnis 1:1 gemischt. Nachdem sämtlicher Puffer von der Nitrocellulosemembran entfernt wurde, wird auf die Membran die vorbereitete Detektionslösung gegeben und für 1 min inkubiert. Die Membran wird anschließend in Folie in eine Röntgenkassette gelegt. Ein Röntgenfilm wird auf die Membran gelegt und für 1h exponiert. Abschließend wird der Röntgenfilm entwickelt, fixiert und getrocknet.

3.2.13 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der RNA erfolgt mit Hilfe des *RNeasy-Kits* von Quiagen. Zur RNA-Isolierung wird das Gewebe auf Eis aufgetaut und der *RNA/later*-Puffer vorsichtig abgezogen. Nach Aufnahme in 600 µl RLT-Lysepuffer, der zuvor mit 6 µl Mercaptoethanol versetzt wurde, werden die Gewebeprobe zur Homogenisation für dreimal 15 sek beschallt. Die Homogenate werden für 3 min bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig vom Sediment entfernt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl 70%igem Ethanol wird die Suspension auf *RNeasy spin columns* aufgetragen und für 15 sek bei 15000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säulen werden mit 350 µl RW1-Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgt eine DNase-Behandlung. Hierzu wird DNase in einer Konzentration von 1 U/µl in einem Volumen von 150 µl RW1-Waschpuffer pro Säule eingesetzt. Die Säulen werden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erfolgt die Zugabe von weiteren 350 µl RW1-Waschpuffer. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation für 15 sek bei 8000 x g. Zwei weitere Waschschrte mit je 500 µl RPE-Waschpuffer folgen. Hierbei erfolgt der erste Sedimentationsschritt bei 8000 x g und der zweite bei 15000 x g. Die RNA wird mit je zweimal 30 µl DEPC-H₂O bei einer Geschwindigkeit von 8000 x g eluiert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration (siehe Gliederungspunkt 3.2.13.1) werden Aliquots à 10 µl hergestellt und bei -70 °C gelagert.

3.2.13.1 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Zur Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration werden die Proben 1:30 mit 1 M Trispuffer HCl (pH 9,5) verdünnt. Die Messung des Nukleinsäuregehaltes erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine weitere Messung bei 280 nm ermöglicht die Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäuren in der entsprechenden

Probe. Mit Einbeziehung des Verdünnungsfaktors lässt sich der jeweilige RNA- bzw. DNA-Gehalt aus den erhaltenen OD-Messwerten berechnen:

RNA-Konzentration:

Gemessene OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x Faktor für RNA [40] = x µg RNA/ml

DNA-Konzentration:

Gemessene OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x Faktor für DNA [50] = x µg DNA/ml

Zudem resultiert aus dem Quotienten, der bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessenen OD-Werte, die Reinheit (RH) der RNA- bzw.:

$$RH = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

Für die nachfolgenden molekularbiologischen Arbeiten sollten nur Proben verwendet werden, deren Reinheit zwischen 1,7- 2,1 liegt.

3.2.14 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) kann man die differentielle Expression von Genen in einem oder mehreren Geweben zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten untersuchen. Das Prinzip der RT-PCR besteht darin, dass man in einem ersten Schritt aus einem beliebigen Gewebe RNA isoliert und daraus über eine Reverse Transkription (RT) komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) herstellt. Diese cDNA dient in einem zweiten Schritt als Matrizenstrang für die Amplifikation des gesuchten Gens über eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR).

3.2.14.1 RT-Reaktion

Für die RT-Reaktion wird die unter Gliederungspunkt 3.2.13 isolierte RNA verwendet. Ausgehend von der gesamten zellulären RNA, erfolgt durch die Verwendung eines Oligo-(dT₁₅)-Primer ausschließlich die Synthese von cDNA aus der zellulären mRNA.

Die RT-Reaktion erfolgt mit Hilfe des *Reverse Transcription Systems* von Promega. Zur Erststrang-Synthese werden 2 µg der behandelten und unbehandelten

Rosettensphäroiden verwendet. Vor der eigentlichen RT-Reaktion wird die RNA für 10 min bei 70°C inkubiert um vorliegende Sekundärstrukturen zu denaturieren.

Der Reaktionsansatz für die RT-Reaktion setzt sich wie folgt zusammen:

- 2 µg der denaturierten Gesamt-RNA
- 4 µl 25 mM MgCl₂
- 2 µl 10 x Reverse Transkriptionspuffer
- 2 µl 10 mM dNTP's
- 0,5 µl RNasin
- 1 µl Oligo-(dT₁₅)-Primer
- 0,75 µl AMV Reverse Transkriptase

Mit nukleasefreiem Wasser wird auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Es folgt eine Inkubation von 1 h bei 42°C, wobei die mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Durch den abschließenden 5 minütigen Inkubationsschritt bei 95°C werden Sekundärstrukturen der cDNA denaturiert. Der denaturierte Reaktionsansatz wird mit nukleasefreiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und bei – 20°C gelagert.

3.2.14.2 PCR-Amplifikation

Die PCR gliedert sich in mehrere Stufen, die mehrmals nacheinander durchlaufen werden und dadurch zu einer starken Amplifikation der Ausgangssequenzen führen. Zuerst wird die zu amplifizierende cDNA denaturiert. Anschließend kommt es in einem zweiten Schritt zur Anlagerung von Oligonukleotid-Primern (*annealing*), die den dritten Schritt, die Synthese von cDNA-Strängen (Elongation), ermöglicht. Werden diese Schritte in mehreren Zyklen nacheinander durchlaufen (Amplifikation), ermöglicht dies den Nachweis geringster Mengen an Ausgangs-DNA.

Für die PCR werden die Reaktionsansätze aus der RT-Reaktion (Gliederungspunkt 3.2.14.1) mit nukleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt und in nachfolgende Reaktion eingesetzt:

10	µl	cDNA
5	µl	10 x Reverse Transkriptionspuffer
3,75	µl	25 mM MgCl ₂
1	µl	10 mM dNTP-Mix
0,5	µl	<i>sense</i> Primer
0,5	µl	<i>antisense</i> Primer
0,5	µl	Taq-DNA-Polymerase
28,75	µl	H ₂ O

Die Temperatur und die Dauer für das *annealing*, sowie die Anzahl der Zyklen richtet sich nach den jeweiligen spezifischen Primern, deren Länge und GC-Gehalt (siehe Tabelle 6).

	Annealingtemperatur	Annealingdauer	Zyklenanzahl
GAPDH	58°C	30 sek	30
Stäbchenopsin	59°C	1 min	30
Rotes Opsin	59°C	1 min	30
Grünes Opsin	59°C	1 min	30
Blaues Opsin	59°C	1 min	30
Violettes Opsin	59°C	1 min	30
GDNF	64°C	1 min	34
TH	59°C	1 min	30

Tabelle 6. Annealingtemperatur- und dauer für spezifische Primer der jeweiligen Gene.

Im Anschluss werden 10 µl des PCR-Ansatzes auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Dazu wird für ein Gelvolumen von 60 ml 0,9 g Agarose in 1 x TAE-Puffer vorsichtig aufgeköcht. Für späteres Sichtbarmachen der aufgetrennten DNA werden 1,5 µl Ethidiumbromid zu der Gel-Lösung gegeben. Wenn das Agarosegel vollständig polymerisiert ist, werden die einzelnen PCR-Ansätze aufgetragen und bei 90 Volt für 1 h aufgetrennt. Die Größe der Fragmente wird durch den Vergleich mit einem DNA-Größenstandard ermittelt.

3.2.15 Klonierung von PCR-Fragmenten

Unter der Klonierung von PCR-Fragmenten versteht man die Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor, der nachfolgend in ein Bakterium eingeschleust wird.

3.2.15.1 PCR-Amplifikation für die Klonierung in den pCRII-Vektor

Für die PCR wird die cDNA aus Gliederungspunkt 3.2.14.1 verwendet. Die PCR erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie in Gliederungspunkt 3.2.14.2 beschrieben.

Im Anschluss werden die Proben mit dem Probenauftragspuffer im Verhältnis 1:5 gemischt und 20 µl dieser Lösung auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei 80 Volt in 1 x TAE-Puffer für 1 bis 2 h. Die erwarteten Fragmentgrößen der einzelnen Ansätze werden mittels eines Größenstandards überprüft und für die Gelelution (Gliederungspunkt 3.2.15.2) mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten.

3.2.15.2 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution erfolgt mit Hilfe der Zentrifugationsmethode. Die mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnittenen DNA-Fragmente werden in ein leeres 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zuvor wurde dieses Reaktionsgefäß zu einem Drittel mit Glaswolle befüllt und in den Boden mittels einer Kanüle ein Loch gestochen. Das mit Glaswolle gestopfte Gefäß mit dem ausgeschnittenen Gelstück wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt. Über einen Zentrifugationsschritt für 5 min bei 12000 rpm wird die DNA aus dem Agarosegel durch die Glaswolle filtriert und in dem größeren Reaktionsgefäß gesammelt. Die Agarose verbleibt in der Glaswolle, während man unter UV-Licht die eluierte DNA in dem anderen Gefäß kontrollieren kann.

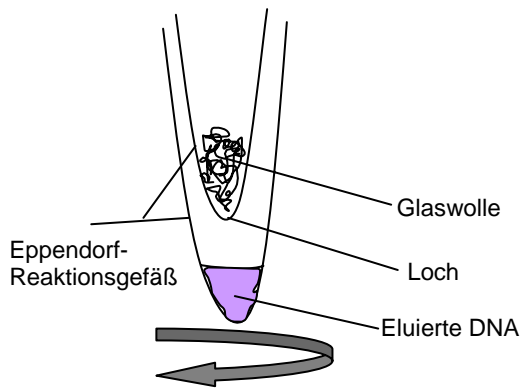


Abbildung 6. Schematische Darstellung der DNA-Elution durch die Zentrifugationsmethode.

Zur Überprüfung der Elution, d. h. ob wirklich nur die erwünschte DNA erhalten wurde, wird das Elutionsprodukt in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (Gliederungspunkt 3.2.14.2).

3.2.15.3 Ligation in den pCRII-Vektor

Die Ligation der PCR-Fragmente in den pCRII-Vektor erfolgt mit Hilfe des *Original TA Cloning Kits* von Invitrogen. Die TA-Klonierung beruht auf der Tatsache, dass die Taq-DNA-Polymerase an die 3'-Enden der synthetisierten DNA-Fragmente ein Adenosin anhängt. Der linearisierte pCRII-Vektor besitzt dagegen auf beiden Seiten der *multi cloning site* (MCS) am 5'-Ende ein Thymidin-Überhang, wodurch eine Ligation von DNA-Fragmenten besonders effizient abläuft.

Das Verhältnis Vektor zu Insert sollte 1:1 betragen und wird mit folgender Formel berechnet:

$$X \text{ ng Insert} = (\text{Insert bp}) * (\text{ng Vektor}) / (\text{Vektor bp})$$

Für die Ligation werden 200 ng des eluierten PCR-Produkt mit 1 µl 10 x Ligationspuffer, 4 µl sterilen Wasser, 2 µl pCRII-Vektor und 1 µl T4 DNA-Ligase in einem Endvolumen von 10 µl bei 14 °C über Nacht inkubiert.

3.2.15.4 Transformation

Die Transformation erfolgt in *E.coli*-Zellen des Stammes DH5α. Hierzu werden 2 µl Ligationsansätze aus Gliederungspunkt 3.2.15.3 vorsichtig mit 50 µl der kompetenten Bakterienzellen vermischt und der gesamte Transformationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für 45 sek.

Nachdem die Bakterienzellen auf Eis abgekühlt, sowie 250 µl SOC-Medium dazugegeben wurden, erfolgt eine Inkubation für 2 h bei 37 °C und 225 rpm. Das Ausplattieren der transformierten Bakterienzellen erfolgt auf LB-Agarplatten, die 100 µg/ml des Antibiotikum Ampicillin enthalten. Die LB-Agarplatten werden vor der Ausplattierung mit 50 µl X-Gal bestrichen und für 10 bis 15 min bei 37 °C zum Trocknen in den Inkubator gestellt. Nachdem der Transformationsansatz in verschiedenen Verdünnungsstufen auf die Platten ausgestrichen wurde, werden die Agarplatten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Durch die Ligation des DNA-Fragments in den Vektor wird das LacZ-Gen in der MCS zerstört und kann somit nicht mehr exprimiert werden. Bei erfolgreicher Klonierung entstehen nur weiße Kolonien. Ist das Insert nicht enthalten, wird das LacZ-Gen vollständig exprimiert und die Klone erscheinen blau. So werden am folgenden Tag weiße Bakterienkolonien, die dementsprechend eine erfolgreiche Insertion des DNA-Fragmentes aufweisen (*blue-white*-Selektion), mit sterilen Zahnstochern von den LB-Agarplatten gepickt und in 5 ml LB-Medium, welches zuvor mit 5 µl Ampicillin (100 mg/ml) versetzt wurde, aufgenommen. Es erfolgt eine Kultivierung über Nacht bei 37 °C und 225 rpm.

3.2.15.5 Mini-Plasmidpräparation zur Überprüfung der Klone

Aus den in Gliederungspunkt 3.2.15.4 angesetzten Übernachtskulturen wird am darauf folgenden Tag die DNA isoliert. Dazu werden 4 ml der Übernachtskulturen bei 5500 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wird vollständig entfernt und das Pellet mit 200 µl STET Puffer, der zuvor mit 10 ng/ml Lysozym versetzt wurde, resuspendiert. Die Suspension wird für 35 sec bei 100°C inkubiert und für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Im folgenden Schritt kann das Pellet mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt werden und der Überstand mit 200 µl Isopropanol versetzt. Die Kulturen werden gut gevortext und für 15 min auf Eis belassen. Es folgt eine abschließende Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm. Der Überstand wird vollständig entfernt und die pelletierte DNA getrocknet, bevor sie mit 30 µl dest. Wasser gelöst wird. Die isolierte Plasmid-DNA wird bei - 20°C gelagert.

3.2.15.6 Restriktionsanalyse

Um zu überprüfen, ob die Plasmide das gewünschte DNA-Fragment enthalten, werden die isolierten Plasmide einer Restriktionsanalyse unterzogen. Mit

Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRI* wird das DNA-Fragment aus der MCS der Plasmide herausgeschnitten. Aufgrund der Tatsache, dass das inserierte Genfragment beiderseits von einer *EcoRI*-Schnittstelle flankiert wird, kann eine erfolgreiche Klonierung anhand der Fragmentgröße überprüft werden.

Der Restriktionsansatz setzt sich aus 1 µl 10 x Puffer, 3 µl sterilen Wasser, 5 µl DNA und 1 µl *EcoRI* (10 U/µl) in einem Endvolumen von 10 µl zusammen und wird bei 37 °C für 1 1/2 h inkubiert. Nach der Inkubation wird der Restriktionsansatz in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Für die Sequenzierung werden nur die Klone mit der erwarteten Fragmentgröße ausgewählt.

Für die Sequenz wird eine Isolierung der Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien mit Hilfe des *Wizards Plus SV minipreps DNA Purification Systems* von Promega durchgeführt. Zur Isolierung der Plasmide werden zunächst 5 ml der Übernachtskulturen für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 250 µl Resuspensionspuffer vollständig resuspendiert. Es folgt die erneute Zugabe von 250 µl Zellysepuffer. Nach viermaligem Invertieren ist es notwendig, das Aufklaren der Zellsuspension abzuwarten (nach ca. 2 bis 5 min). Danach werden 10 µl der Alkalinen Protease-Lösung dazugegeben, wieder vorsichtig invertiert und ein weiteres Mal für 5 min inkubiert. Die Alkaline Protease-Lösung inaktiviert unter anderem Endonukleasen und andere Proteine, welche die Qualität der isolierten Plasmid-DNA beeinträchtigen könnten. Um Proteine auszufällen, werden 350 µl Neutralisationspuffer dazugegeben, invertiert und bei 21000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das klare Lysat wird auf die Säulen gegeben und für 1 min bei 21000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und 750 µl Waschpuffer, welcher zuvor mit 95 % Ethanol versetzt wurde, auf die Säulen gegeben und erneut für 1 min zentrifugiert. Der Durchlauf wird wieder verworfen und der letzte Waschschrift mit 250 µl Waschpuffer wiederholt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 2 min bei 21000 x g. Eluiert wird die Plasmid-DNA mit 100 µl nukleasefreiem Wasser durch einen Zentrifugationsschritt für 2 min bei 21000 x g. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes und der Reinheit erfolgt mit Hilfe einer photometrischen Messung bei 260 nm und 280 nm (siehe Gliederungspunkt 3.2.13.1).

Die entsprechenden Plasmide werden mit einem spezifischen Primer (M13-*forward*-Primer) mit der Kettenterminationsmethode (Sanger et al., 1977) über das Sequenzierlabor *SeqLab* (Göttingen) sequenziert.

3.2.15.7 Midi-Plasmidpräparation

Die Midi-Plasmidpräparation erfolgt mit dem *Nucleobond AX Plasmid Purification Kit* von Machery-Nagel. Nach Erhalt der analysierten Sequenzen und einem sich anschließenden Sequenzvergleich werden mit den „besten“ Klonen Übernachtskulturen angesetzt. Es erfolgt eine Midi-Plasmidpräparation, die für die weiteren molekularbiologischen Arbeiten eine höhere Ausbeute und Reinheit an Plasmid-DNA ermöglicht. Für die Plasmidpräparation werden 50 ml LB-Medium mit 50 µl Kanamyzin (50 mg/ml) versetzt und mit den entsprechenden transformierten Bakterienstocks angeimpft. Kultiviert wird wieder über Nacht bei 37 °C und 225 rpm. Die Übernachtskulturen werden zunächst für 10 min mit 5000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit 4 ml S1-Puffer resuspendiert. Es werden weitere 4 ml des S2-Lysepuffer dazugegeben und vorsichtig invertiert. Es folgt ein Inkubationsschritt für 5 min bei Raumtemperatur. Um die Proteine auszufällen, werden 4 ml S3-Puffer dazugegeben. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis folgt ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 5000 x g. Es erfolgt die Äquilibration der Säule mit 2,5 ml N2-Puffer. Anschließend wird die Säule mit dem Lysat beladen. Ist das Lysat vollständig in die Säulenmatrix eingelaufen, wird mit 5 ml N3-Waschpuffer zweimal gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wird mit 5 ml N5-Puffer eluiert. Aus dem Eluat wird die DNA, durch Zugabe von 3,6 ml Isopropanol bei einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur und weiteren 10 min bei -20 °C, gefällt. Nachdem für 30 min bei 5000 x g zentrifugiert wurde, wird das Pellet mit 50 µl 70%igem Ethanol resuspendiert und für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Nach kurzem Trocknen wird die DNA in sterilem Wasser aufgenommen. Es erfolgt die Bestimmung des DNA-Gehaltes bei 260 nm (siehe Gliederungspunkt 3.2.13.1).

3.2.16 Subklonierung in den pCMS-EGFP-Vektor

Für die Transfektionsmethode werden Expressionsvektoren benötigt, die zum einen den Einbau von Fremd-DNA in das Genom der zu transfizierenden Zellen erlauben, zum anderen einen Expressionsmarker besitzen, durch welchen eine

erfolgreiche Expression überprüft werden kann. Die in den pCRII-Vektor ligierten Fragmente werden wie in den folgenden Abschnitten beschrieben in den Expressionsvektor pCMS-EGFP von Clontech subkloniert.

3.2.16.1 Restriktion von Plasmidvektoren

Endonukleasen erlauben das gezielte Schneiden von doppelsträngiger DNA an für die Nukleasen spezifischen Stellen. Hierdurch können Fragmente gezielt aus einem Plasmidvektor ausgeschnitten werden. In dieser Arbeit wurde das Restriktionsenzym EcoR1 verwendet, welches DNA an einer palindromischen Sequenz schneidet. Dabei entstehen übereinander hängende Enden des DNA Doppelstrangs (*sticky ends*), welche bevorzugt DNA-Fragmente binden, die ebenfalls mit EcoR1 geschnitten wurden.

Für einen 20 µl Ansatz werden 2 µg eines aufzureinigenden Plasmides mit µl EcoR1-Puffer und 2 µl EcoR1 vermischt und der Ansatz mit sterilen Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 4°C über Nacht inkubiert. Die ausgeschnittenen Fragmente werden über eine Gelelektrophorese getrennt.

3.2.16.2 Ligation in pCMS-EGFP-Expressionsvektor

In diesem Abschnitt erfolgt die Ligation in den Expressionsvektor pCMS-EGFP. Dieser Vektor trägt eine prokaryotische Transkriptionsstelle (Col E1), was die Replikation durch Bakterien ermöglicht. Durch ein Ampicillin-Resistenzgen (AMP^r) können plasmidtragende Bakterien selektiert werden. Eine virale Promotorregion (P_{cmv}) dient als Ansatzstelle für eukaryotische RNA-Polymerasen. Hierdurch wird die Transkription eines in die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors eingebrachte DNA nach der Transfektion in eukaryotische Zellen ermöglicht. Ein zusätzliches eukaryotisches Reportergen codiert für das grün fluoreszierende Protein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) welches eine erfolgreiche Transfektion durch grün fluoreszierende Zellen anzeigt. Es wird über eine SV-40-Promotorregion aktiviert.

Für die Ligation wird der Vektor mit EcoR1- geöffnet und dessen Enden dephosphoryliert, um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Die zu ligierenden Fragmente wurden mit EcoR1 aus dem pCRII-Vektor (siehe

Gliederungspunkt 3.2.16.1) ausgeschnitten, aufgetrennt und aus dem Agarosegel eluiert.

Der Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 1 µl dephosphorylierter pCMS-EGFP-Vektor
- 3 µl DNA-Fragment
- 1 µl T4-Ligasepuffer
- 1 µl T4-Ligase
- 4 µl H₂O dest.

Die Ligation erfolgt bei 14°C über Nacht.

Da die bei der Restriktion gebildeten Schnittstellen eine Ligation in zwei gegensätzliche Orientierungen zulässt, ist es notwendig die Orientierung des Fragments durch eine Sequenzierung (Gliederungspunkt 3.2.15.6) zu überprüfen. Die Überprüfung der Orientierung erfolgt nach der Transformation in *E.coli* Bakterienzellen des Stammes DH5α (Gliederungspunkt 3.2.15.4).

Nach der erfolgreichen Überprüfung der Orientierung können vom gewünschten Klon Übernachkulturen angesetzt werden (Gliederungspunkt 3.2.15.4) und mittels einer Midi-Plasmidpräparation (Gliederungspunkt 3.2.15.7) isoliert und aufgereinigt werden. Nachdem die DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt wurden, können die Plasmide bei -20°C gelagert werden, bis sie z.B. zu Transfektion in Gliederungspunkt 3.2.7 zum Einsatz kommen.

3.2.17 Kryokonservierung von *E.coli*-Zellen

Für eine Langzeitlagerung werden die *E.coli*-Zellen als Glycerolstocks kryokonserviert. Dazu werden 250 µl der Zellsuspension mit 250 µl Glycerin vorsichtig miteinander vermengt und bei -80 °C gelagert.

3.2.18 Sterilisation von Medien und Glaswaren

Für die Bakterienkultivierung und das Arbeiten mit Nukleinsäuren, insbesondere mit RNA, ist es unerlässlich, dass die verwendeten Medien, Puffer und Glaswaren sterilisiert werden. Die Sterilisation der Medien und Puffer erfolgt durch

das Autoklavieren bei 120 °C und 2 bar für 20 min. Glaswaren werden für 8 h bei 180 °C im Trockenschrank gebacken.

3.2.19 Dokumentation und Bildbearbeitung

Die Dokumentation der Agarosegele erfolgt mit Hilfe eines UV-Leuchttisches, auf dem eine Polaroidkamera befestigt ist. Die aufgenommenen Bilder können gescannt werden und mittels des Programms Multianalyst 2.0 (Biorad) einer densitometrischen Quantifizierung unterzogen werden. Die Dokumentation der histologischen Präparate erfolgt mit Hilfe eines Zeiss Axiophots mit Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung. Die digitalisierten Bilder werden mit Hilfe des Programms Photoshop Deluxe (Adobe) bearbeitet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Analyse der für die Entwicklung relevanten Effekte von neurotrophen Faktoren durch *gain-of-function*-Experimente

4.1.1 Die Proliferationsrate in Rosettensphäroiden wird durch GDNF, PEDF und BDNF signifikant gesteigert

Neurotrophe Faktoren üben unterschiedlichste Funktionen auf verschiedene Zelltypen während diverser Entwicklungsprozesse der Retinogenese aus. In einigen Prozessen unterscheiden sich die unterschiedlichen Faktoren in ihrem Einfluss, in anderen Prozessen scheinen alle eine ähnliche Rolle inne zu haben. Unter diese Entwicklungsprozesse gehört die Proliferation von Zellen, insbesondere von Neuronen, die wie mehrfach gezeigt durch den Einfluss von neurotrophen Faktoren gefördert werden kann. In diesem Zusammenhang sollte zunächst geklärt werden, wie sich GDNF, PEDF und BDNF auf die Proliferation von retinalen Zellen in Rosettensphäroiden auswirken.

Für den Nachweis von Proliferation wurden Rosettensphäroide in Minimalmedium und unter der Zugabe von exogenen GDNF, PEDF bzw. BDNF für 8 Tage kultiviert. An den Kulturtagen 2, 4, 6 und 8 wurden jeweils behandelte Rosettensphäroide und unbehandelte Kontrollsphäroide geerntet und für die Herstellung von Kryostatschnitten fixiert. Die Kryostatschnitte wurden dann einer PCNA-Färbung unterzogen. Für eine Quantifizierung von proliferierenden retinalen Zellen, wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gefärbt.

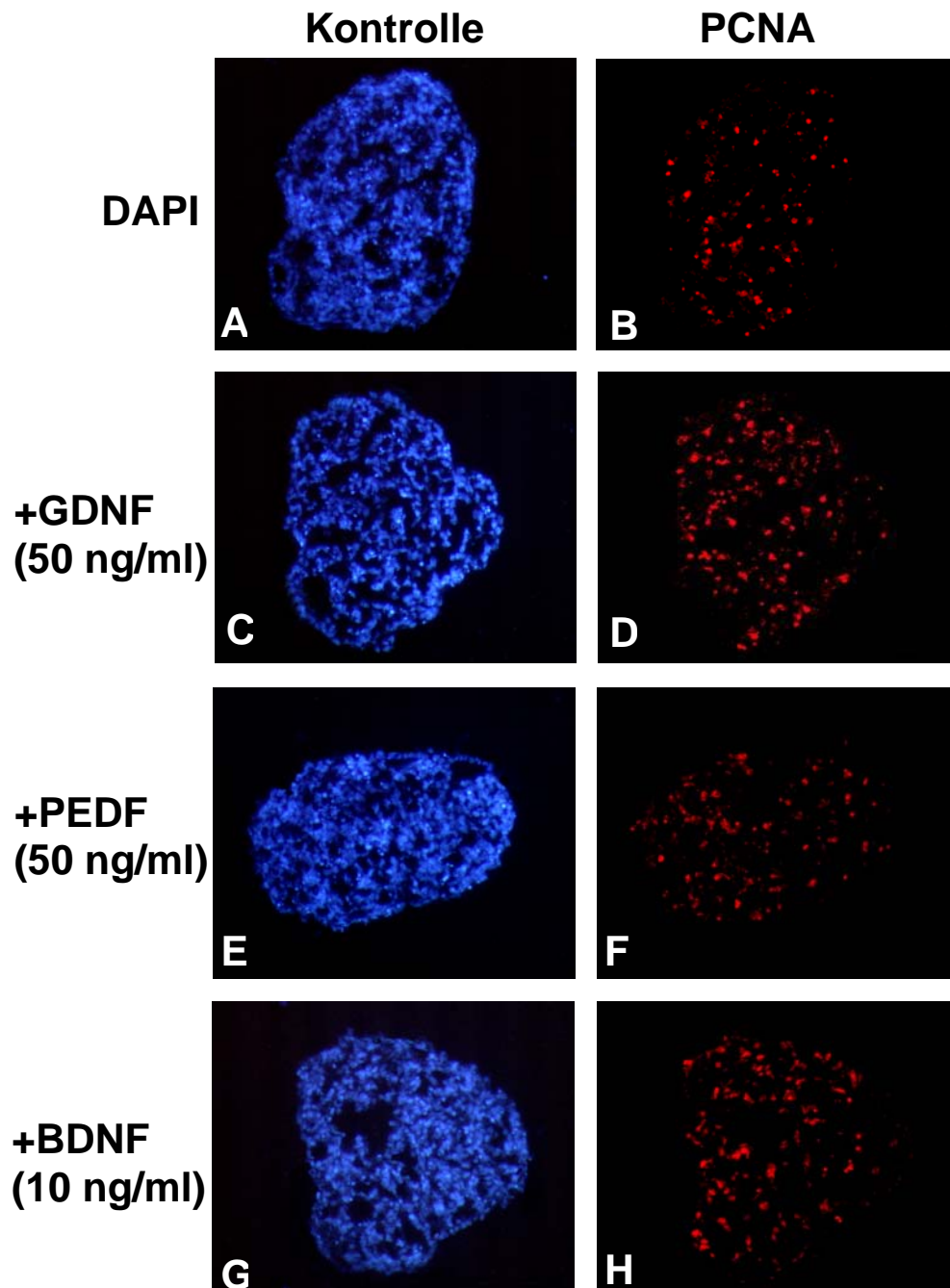


Abbildung 7. Proliferationsnachweis in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden des Kulturtages 2. **A:** Rosettensphäroid unter Kontrollbedingungen, der mit DAPI gefärbt wurde. **B:** PCNA-Färbung in einem Kontrollsphäroid. **C:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids nach GDNF-Behandlung. **D:** PCNA-Färbung eines Rosettensphäroids nach GDNF-Behandlung. **E:** Rosettensphäroid, der mit PEDF behandelt wurde, und mit DAPI gefärbt wurde. **F:** PCNA-Färbung in einem Rosettensphäroid, der mit PEDF behandelt wurde. **G:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids nach BDNF-Behandlung. **H:** BDNF-behandelter Rosettensphäroid, der mit PCNA gefärbt wurde. Zu diesem frühen Kulturzeitpunkt sind in den mit GDNF, PEDF bzw. BDNF-behandelten Kulturen wesentlich mehr PCNA-positive Zellen nachzuweisen, als in den Kontrollen. Balken = 100 µm.

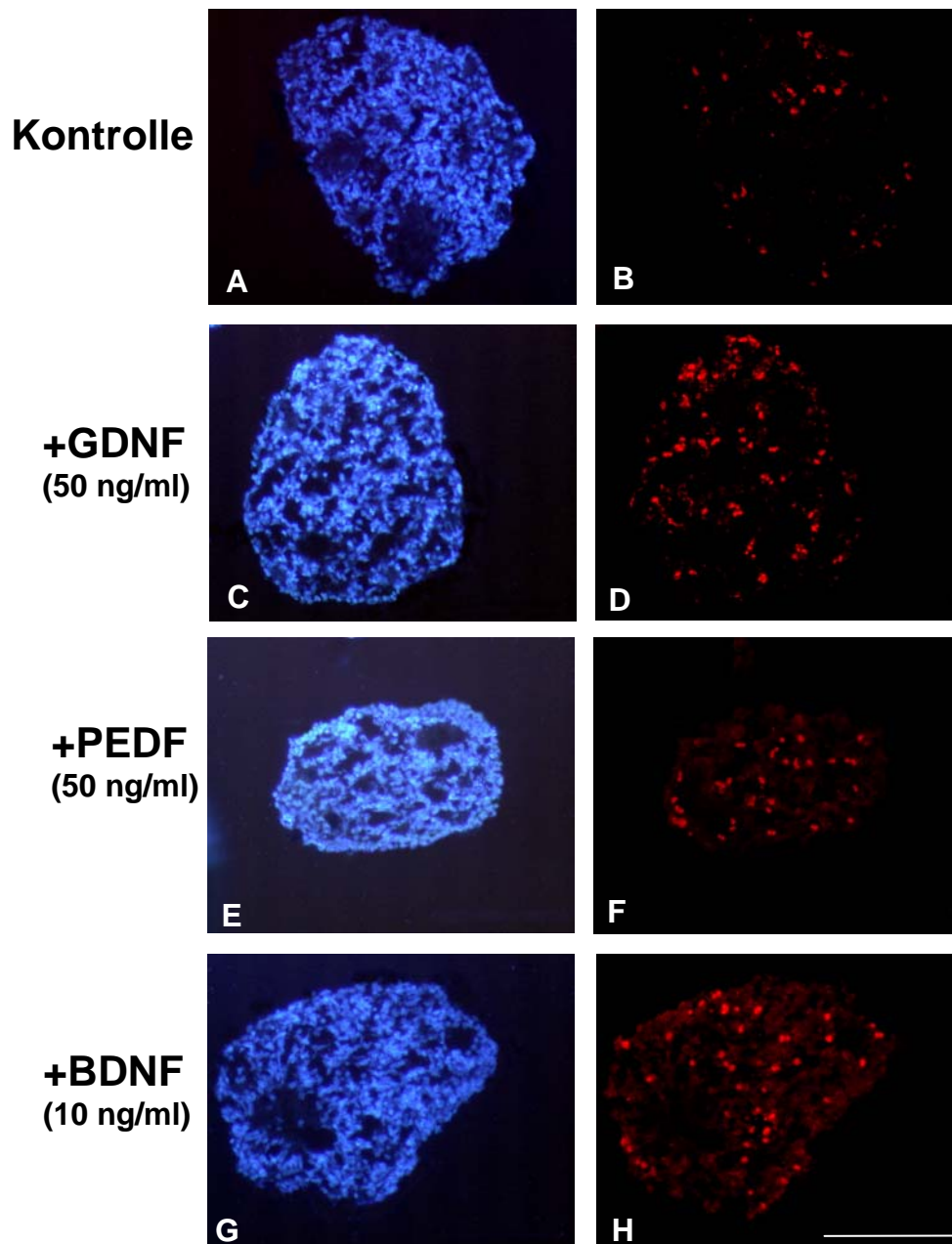


Abbildung 8. Proliferationsnachweis in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden des Kulturtages 4. **A:** Rosettensphäroid unter Kontrollbedingungen, der mit DAPI gefärbt wurde. **B:** PCNA-Färbung in einem Kontrollsphäroid. **C:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids nach GDNF-Behandlung. **D:** PCNA-Färbung eines Rosettensphäroids nach GDNF-Behandlung. **E:** Rosettensphäroid, der mit PEDF behandelt wurde, und mit DAPI gefärbt wurde. **F:** PCNA-Färbung in einem Rosettensphäroid, der mit PEDF behandelt wurde. **G:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids nach BDNF-Behandlung. **H:** BDNF-behandelter Rosettensphäroid, der mit PCNA gefärbt wurde. Zu diesem Kulturzeitpunkt zeigt sich der Effekt der Neurotrophen Faktoren signifikant verstärkt, was die Anzahl PCNA-positiver Zellen betrifft. Balken = 100 μ m.

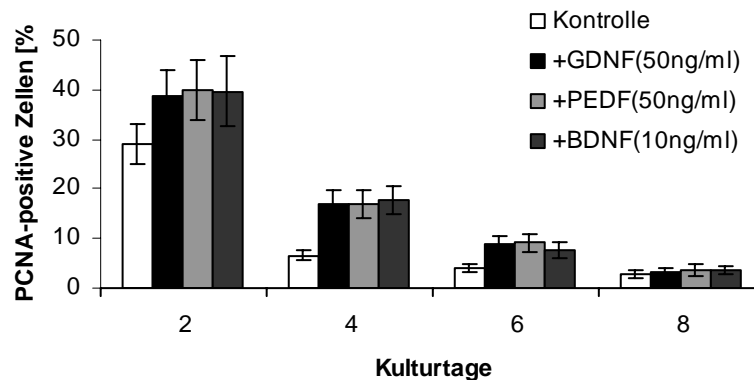


Abbildung 9. Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen in unbehandelten und behandelten Rosettensphäroiden der Kulturtag 2, 4, 6 und 8. DAPI-positive Zellen wurden gleich 100% gesetzt und die PCNA-positiven Zellen jeweils in Relation gezogen. Die Analyse verdeutlicht den proliferierenden Effekt von GDNF, PEDF und BDNF vor allem zu frühen Entwicklungszeitpunkten.

Der Proliferationsnachweis in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden zeigte zu den früheren Entwicklungszeitpunkten eine signifikante Erhöhung in der Proliferationsrate, nachdem Rosettensphäroide mit GDNF, PEDF bzw. BDNF behandelt wurden (Abbildungen 7 und 8). Verdeutlicht wird dieser Effekt durch die Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen in Abbildung 9. Während am Kulturtag 2 in Kontrollkulturen die Proliferationsrate 29% betrug, zeigten Kulturen, die mit GDNF behandelt wurden, eine Proliferationsrate von 38%, PEDF-Kulturen ca. 40% und Kulturen, die mit BDNF behandelt wurden eine Rate von 39 %. Noch deutlicher verstärkt enthüllte sich der proliferierende Effekt der eingesetzten neurotrophen Faktoren an den folgenden Kulturtagen 4 und 6: An diesen beiden Kulturtagen war die Proliferationsrate in den unbehandelten Kontrollkulturen (4-6%) höchstens halb so hoch wie in den behandelten Rosettensphäroiden (8-16%). Während am Kulturtag 4 in den behandelten Kulturen eine Proliferationsrate von 16% nachgewiesen werden konnte, wurden in Kontrollen nur 6% an Zellen detektiert, die PCNA-positiv waren. Am letzten untersuchten Kulturtag 8 zeigte sich der proliferierende Effekt von GDNF, PEDF und BDNF nahezu aufgehoben. Zwischen Kontrollen und behandelten Kulturen konnten keine signifikanten Unterschiede mehr in der Proliferationsrate festgestellt werden. In allen analysierten Kulturen betrug die Proliferationsrate zu diesem späten Entwicklungszeitpunkt lediglich 2-3%. Diese

Ergebnisse zeigen einen signifikanten Proliferations-fördernden Effekt von GDNF, PEDF und BDNF, der die Proliferationsrate über längere Entwicklungszeit erhöht.

4.1.2 Die Zugabe von exogenen GDNF, PEDF oder BDNF führt zu einer signifikanten Abnahme von Apoptose in Rosettensphäroiden

Mehrfach konnte gezeigt werden, dass neurotrophe Faktoren sich besonders auf das Überleben von verschiedensten Zellpopulationen positiv auswirken. In diesem Zusammenhang sollte in diesem Teil der Arbeit geklärt werden, welchen Einfluss GDNF, PEDF und BDNF auf das Überleben von retinalen Zellen in Rosettensphäroiden haben. Mit Nachweis von Zellen, die dem programmierten Zelltod, der Apoptose, verfallen sind, sollte der Effekt auf das Überleben gezeigt werden. Die Detektion der apoptotischen Zellen an Kryostatschnitten von Rosettensphäroiden erfolgte über den TUNEL-Nachweis, bei dem Strangbrüche in der DNA markiert werden, die während der Apoptose eintreten. Die apoptotischen Zellen können mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden.

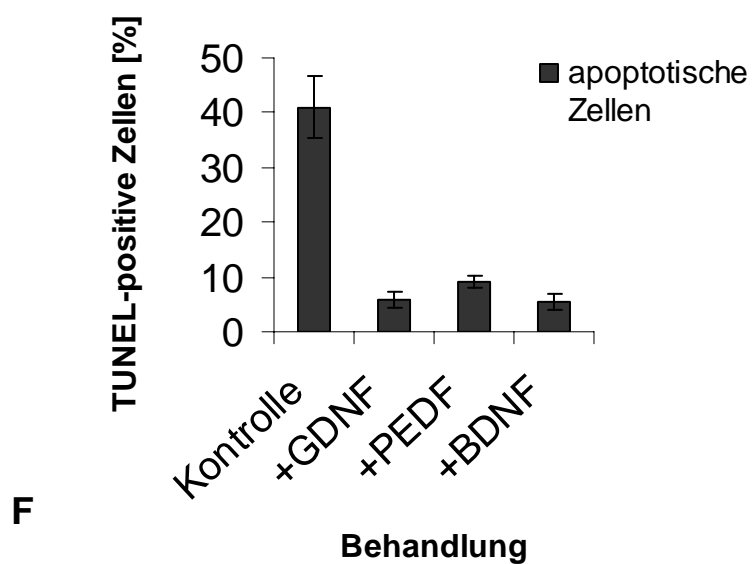
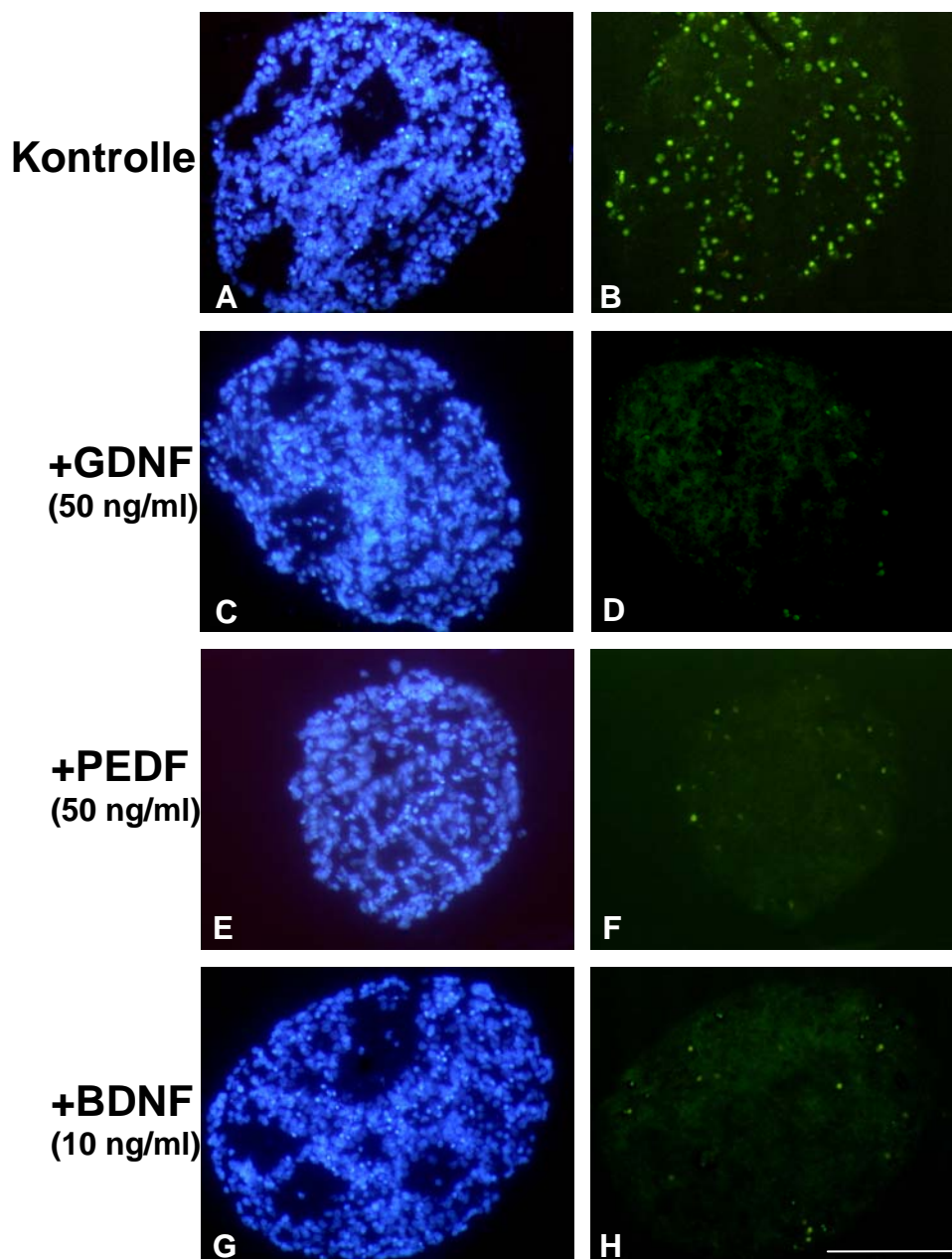


Abbildung 10. Die Zugabe von exogenen neurotrophen Faktoren führt zu einer signifikanten Abnahme der Apoptose in Rosettensphäroiden des Kulturtages 10. Die immunhistochemische Detektion apoptotischer Zellen erfolgte mit einem TUNEL-Nachweis in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden. Für eine Quantifizierung wurden zusätzlich die Zellkerne mit DAPI angefärbt. **A:** DAPI-Färbung in Kontrollsphäroiden. **B:** TUNEL-Nachweis in unbehandelten Kontrollsphäroiden. Deutlich sind viele TUNEL-positive Zellen zu erkennen. **C:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids, nach der Behandlung mit exogenen GDNF. **D:** TUNEL-positive Zellen in mit GDNF behandelten Rosettensphäroiden. **E:** Gezeigt ist die DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids, der mit PEDF behandelt wurde. **F:** Nachweis der TUNEL-positiven Zellen in mit PEDF behandelten Sphäroiden. **G:** DAPI-Färbung in einem Rosettensphäroid, der mit BDNF behandelt wurde. **H:** TUNEL-Nachweis in mit BDNF behandelten Sphäroiden. **F:** Quantifizierung der apoptotischen Zellzahlen von (B), (D), (F) und (H). Die Zellzahlen der DAPI-positiven Zellen wurden jeweils gleich 100% gesetzt und die TUNEL-positiven Zellen in Relation gezogen. Die Quantifizierung zeigt, im Vergleich mit der Kontrolle, eine deutliche Abnahme in der Apoptose, nach Behandlung mit den jeweiligen neurotrophen Faktoren. Balken = 100 µm.

Der TUNEL-Nachweis zeigte auffallende Effekte des Einsatzes von neurotrophen Faktoren wie GDNF, PEDF und BDNF im Rosettensphäroidsystem. Rosettensphäroide, die mit GDNF, PEDF bzw. BDNF behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den Kontrollen, dramatische Effekte auf die Apoptose, bzw. auf das Überleben der retinalen Zellen. Der große Einfluss der Faktoren verifiziert sich vor allem in der Quantifizierung in Abbildung 10F. Während in Kontrollsphäroiden über 40% der Zellen apoptotisch waren, konnten in GDNF-behandelten Rosettensphäroiden lediglich nur noch 6% TUNEL-positive Zellen nachgewiesen werden. Ähnlich sah die Situation in Rosettensphäroiden aus, denen während der Kultivierung PEDF zugegeben wurde: In diesen Kulturen waren ca. 9% aller Zellen apoptotisch. Weniger apoptotische Zellen konnten wiederum in den BDNF-behandelten Sphäroiden nachgewiesen werden. Hier wurden, ähnlich wie in den GDNF-Kulturen, nur 5,6% TUNEL-positive Zellen detektiert. Diese dramatischen Effekte der neurotrophen Faktoren auf die Apoptose unterstützen die fördernden Einflüsse der verschiedensten Faktoren auf das Überleben von retinalen Zellen *in vitro*.

4.1.3 Die Organisation der Rosettensphäroidstruktur wird durch PEDF erheblich gestört, durch GDNF aber stimuliert

Um die Organisation der charakteristischen Rosettensphäroidstruktur detaillierter aufklären zu können, kann man das „Stützgerüst“ der Sphäroide sichtbar machen. Dieses Stützgerüst besteht aus den sog. „Stützzellen“ der Retina, den Müllerzellen. In diesem Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob neurotrophe Faktoren wie GDNF und PEDF sich auf die Organisation der Müllerzellen, folglich der Rosettensphäroidstruktur, auswirken. Der Nachweis der Müllerzellen kann über eine immunhistochemische Färbung mittels eines monoklonalen Antikörpers, der gegen Glutaminsynthetase gerichtet ist, erfolgen. Für einen zusätzlichen Vergleich wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

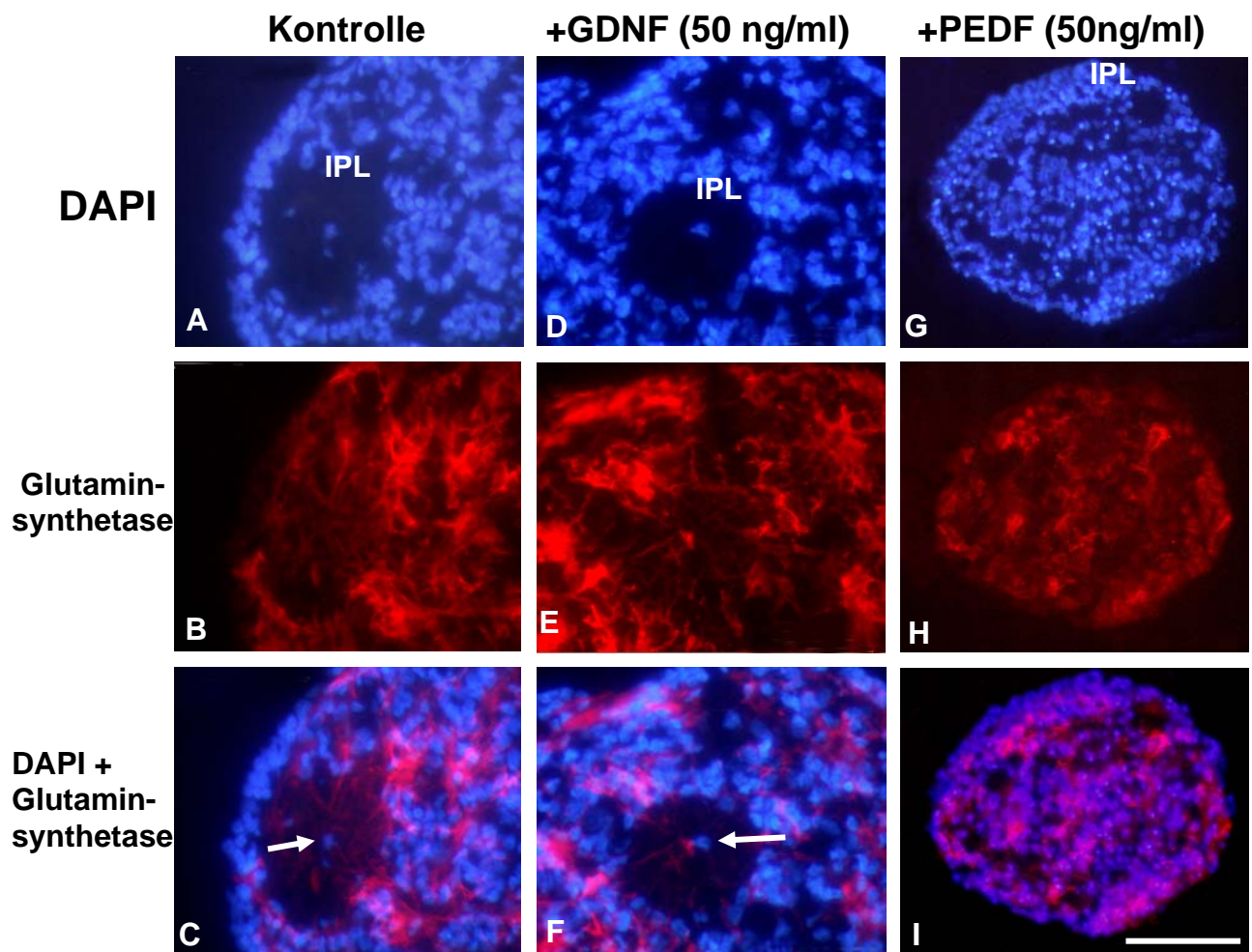


Abbildung 11. Nachweis der Sphäroidstruktur anhand der immunhistochemischen Färbung der Müllerzellen in Rosettensphäroiden des Kulturtages 10. Doppelfärbungen mit einem monoklonalen Antikörper der gegen Glutaminsynthetase gerichtet ist. Für einen besseren Überblick

sind die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **A:** DAPI-Färbung eines Kontrollsphäroids. **B:** Glutaminsynthetase-Färbung eines Sphäroids, der unter Kontrollbedingungen kultiviert wurde. **C:** Übereinanderlagerung von (A) und (B). **D:** DAPI-Färbung in einem mit GDNF behandelten Sphäroid. **E:** Glutaminsynthetase-Färbung in einem Sphäroid, der mit GDNF behandelt wurde. **F:** Übereinanderlagerung von (D) und (E). **G:** DAPI-Färbung eines mit PEDF behandelten Sphäroids. **H:** Glutaminsynthetase-Färbung in einem mit PEDF behandelten Sphäroid. **I:** Übereinanderlagerung von (G) und (H). Gezeigt sind vor allem IPL-Bereiche der Sphäroide in Kontrollen und nach der GDNF-Behandlung. Im Zentrum der IPL-Bereiche befinden sich einzelne Zellen (Pfeile). Deutlich zeigt sich eine gestörte Rosettensphäroidstruktur nach der Behandlung mit PEDF. Balken = 50 µm in A,B,C,D,E,F; 100 µm in G,H,I.

Die Zugabe von exogenen GDNF und PEDF führte zu unterschiedlichen Ausbildungen der Rosettensphäroidstruktur. Im Vergleich mit den Kontrollkulturen in Abbildung 11A, B, zeigten Sphäroide, denen 50 ng/ml GDNF zugegeben wurde (Abbildung 11D, E), zu diesem Zeitpunkt keine auffälligen Veränderungen in der Struktur. Unter beiden Kulturbedingungen wurden vor allem die IPL-Bereiche groß ausgebildet. Deutlich zeigten sich Fortsätze der Müllerzellen, die in das Zentrum der IPL-Bereiche zu den innen liegenden Zellen projizieren (siehe Pfeile in Abbildung 11C, F). Die Zugabe von exogenen 50 ng/ml PEDF hatte dramatische Effekte auf die Organisation der Rosettensphäroidstruktur: Es konnten nur wenige IPL-Bereiche und kaum Rosettenbereiche identifiziert werden und allgemein waren die Sphäroide kleiner ausgebildet, verglichen mit Kontrollen oder nach der GDNF-Behandlung. Wenn IPL-Bereiche ausgebildet wurden, waren diese sehr klein in ihrem Ausmaß. Es konnte keine Struktur, mit im Zentrum der IPL-Bereiche liegenden Zellen, nachgewiesen werden (Abbildung 11G, I). PEDF hat folglich einen inhibierenden Effekt auf die Ausbildung von Müllerzellen und somit auf eine geordnete Rosettensphäroidstruktur.

4.1.3.1 GDNF stimuliert die Ausbildung und das Überleben von Müllerzellen

Um die Strukturen und Müllerzellen zu späteren Zeitpunkten zu analysieren, wurden zusätzlich Rosettensphäroide des Kulturtages 12 mit dem Antikörper gegen Glutaminsynthetase gefärbt. Die Zellkerne wurden wiederum mit DAPI sichtbar gemacht.

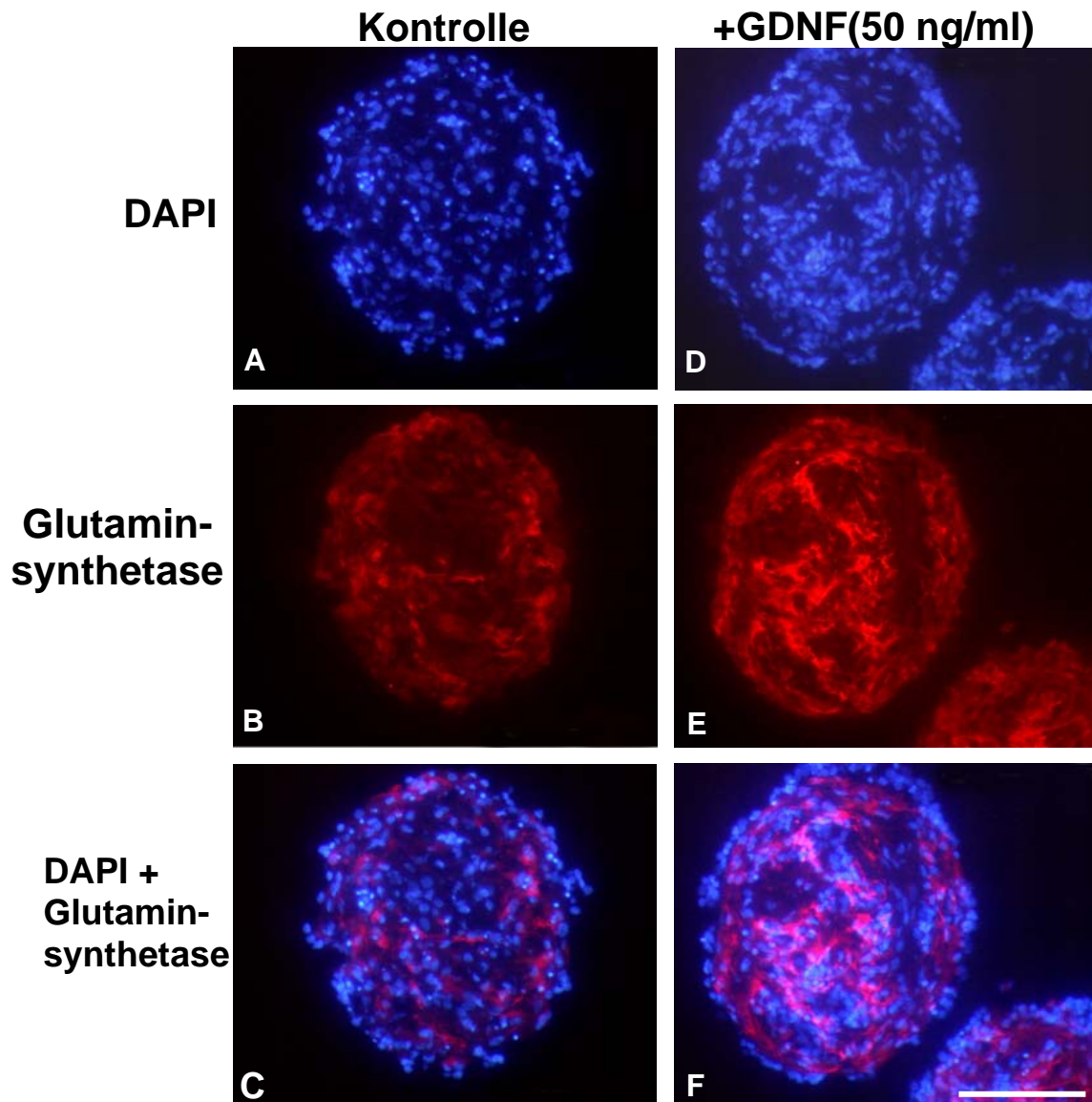


Abbildung 12. Nachweis der Sphäroidstruktur anhand der immunhistochemischen Färbung der Müllerzellen in Rosettensphäroiden des Kulturtages 12. Doppelfärbungen mit einem monoklonalen Antikörper der gegen Glutaminsynthetase gerichtet ist. Für einen besseren Überblick sind die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **A:** DAPI-Färbung eines Kontrollsphäroids. **B:** Glutaminsynthetase-Färbung eines Sphäroids, der unter Kontrollbedingungen kultiviert wurde. **C:** Übereinanderlagerung von (A) und (B). **D:** DAPI-Färbung in einem mit GDNF behandelten Sphäroid. **E:** Glutaminsynthetase-Färbung in einem Sphäroid, der mit GDNF behandelt wurde. **F:** Übereinanderlagerung von (D) und (E). Im Vergleich zu den Kontrollen, sind Müllerzellen nach der GDNF-Behandlung wesentlich distinkter ausgebildet. Die Rosettensphäroidstruktur ist zu diesem späten Entwicklungszeitpunkt aufgrund der Behandlung mit GDNF noch weitgehend erhalten, während sie in Kontrollkulturen verloren gegangen erscheint. Balken = 100 µm.

Die Glutaminsynthetasefärbung am Kulturtag 12 enthüllte für die Müllerzellen einen stimulierenden Effekt, ausgeübt durch GDNF. In den Kontrollen (Abbildung 12A, B, C) scheint die Rosettensphäroidstruktur verloren gegangen zu sein. Die Situation erinnert stark an den Einfluss von PEDF auf die Müllerzellen am Kulturtag 10. Wurde GDNF zu den Kulturen zugegeben, konnten weiterhin Müllerzellen, sowie IPL-Bereiche, identifiziert werden (Abbildung 12D, E, F). GDNF zeigt sich hier stimulierend auf die Erhaltung von Müllerzellen, und damit auf die Erhaltung der Rosettensphäroidstruktur.

4.1.3.2 GDNF vermag die Struktur-störenden Effekte von PEDF aufzuheben

Aufgrund der dramatischen Effekte von PEDF für die Organisation der Rosettensphäroidstruktur und dem stimulierenden Effekt von GDNF für die Müllerzellen, stellt sich die Frage, ob die Kombination von mehreren Faktoren eine Veränderung zu Folge hat. Dafür wurden Rosettensphäroide in der Kombination von GDNF und PEDF, sowie von GDNF und BDNF behandelt. Erneut sollten über die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen Glutaminsynthetase und der Zellkern-Färbung mit DAPI die Strukturen geklärt werden.

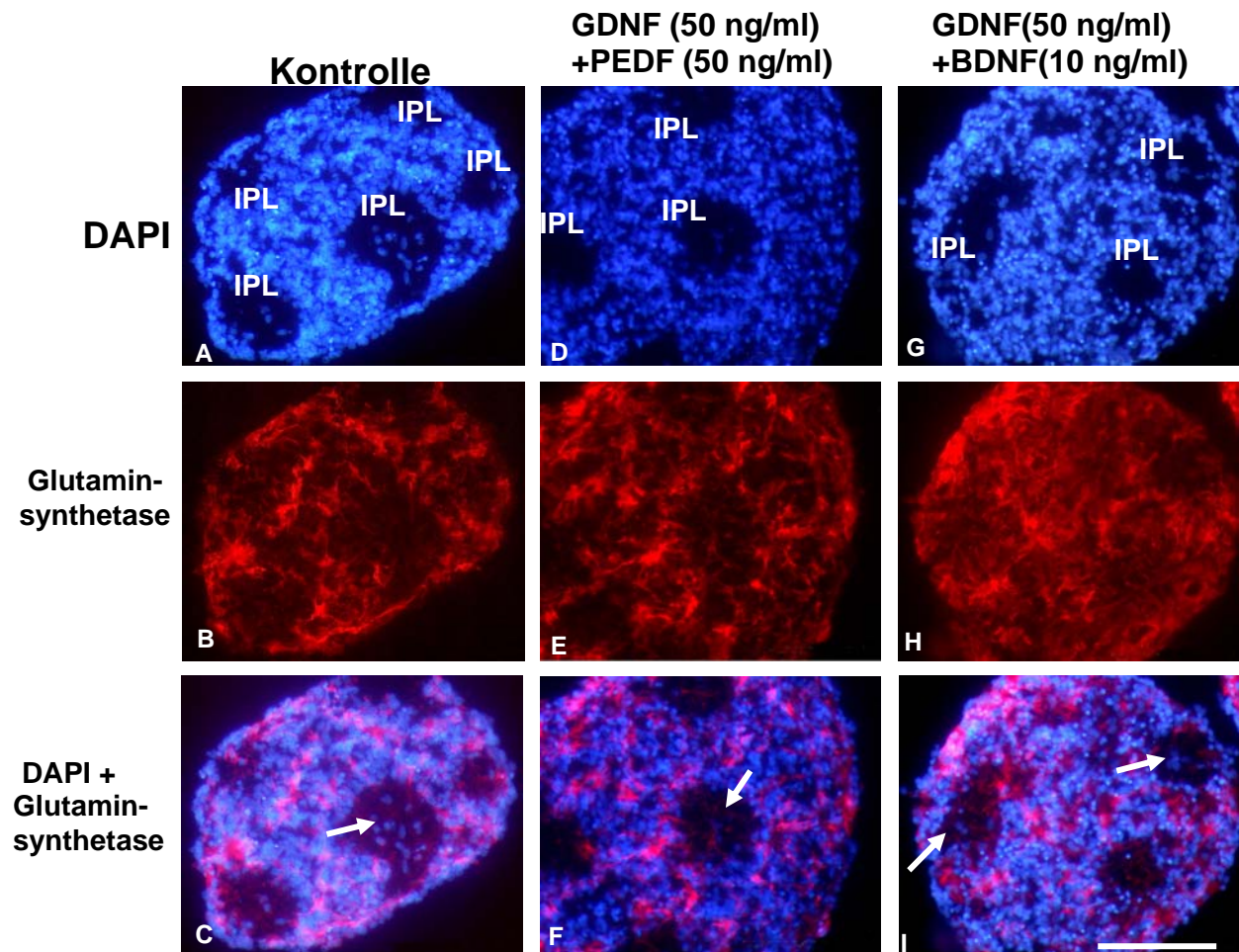


Abbildung 13. Organisation der Sphäroidstruktur in mit kombinierten Faktoren behandelten Rosettensphäroiden des Kulturtages 10. Doppelfärbungen mit einem monoklonalen Antikörper der gegen Glutaminsynthetase gerichtet ist. Für einen besseren Überblick sind die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **A:** DAPI-Färbung eines Kontrollsphäroids. **B:** Glutaminsynthetase-Färbung eines Sphäroids, der unter Kontrollbedingungen kultiviert wurde. **C:** Übereinanderlagerung von (A) und (B). **D:** DAPI-Färbung in einem Sphäroid, der mit GDNF und PEDF in Kombination behandelt wurde. **E:** Glutaminsynthetase-Färbung in einem GDNF/PEDF-behandelten Sphäroid. **F:** Übereinanderlagerung von (D) und (E). **G:** DAPI-Färbung eines mit GDNF und BDNF in Kombination behandelten Sphäroids. **H:** Glutaminsynthetase-Färbung in einem GDNF/BDNF-behandelten Sphäroid. **I:** Übereinanderlagerung von (G) und (H). Deutlich zu sehen sind mehrere IPL-Bereiche, mit in ihrem Zentrum liegenden Zellen (Pfeile). Unter allen Kulturbedingungen zeigen sich ähnliche Organisationen der Rosettensphäroidstruktur. Balken = 100 µm.

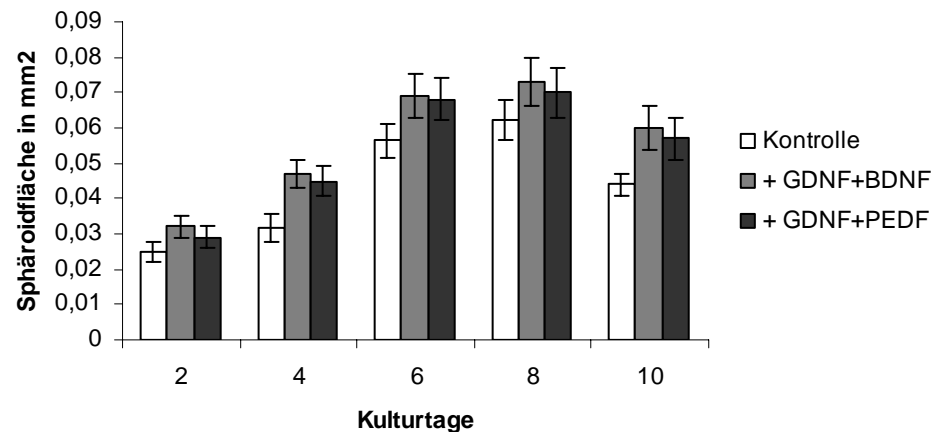


Abbildung 14. Größenverhältnisse der Rosettensphäroide nach der Behandlung mit kombinierten Faktoren. Das Diagramm zeigt eine deutliche Größenzunahme der Kulturen, nachdem diese mit GDNF und BDNF, bzw. GDNF und PEDF in Kombination behandelt wurden.

Die Kombination von neurotrophen Faktoren ändert die Folgen der in Gliederungspunkt 4.1.3 beschriebenen Effekte. In den Kulturen, die mit 50 ng/ml GDNF und 50 ng/ml PEDF in Kombination behandelt wurden, konnten mehrere IPL-Bereiche detektiert werden. Dasselbe Bild zeigte sich nach der Behandlung von 50 ng/ml GDNF und 10 ng/ml BDNF in Kombination. Es wurden auch in diesen Kulturen mehrere größere IPL-Bereiche ausgebildet. Im Zentrum der IPL-Bereiche konnten wieder mehrere einzelne Zellen nachgewiesen werden (Pfeile in Abbildung 13C, F, I). Zudem präsentierten sich Kulturen, die mit neurotrophen Faktoren in Kombination behandelt wurden, wesentlich größer ausgebildet (vgl. Abbildung 14).

Die signifikanteste Erkenntnis aus diesen Ergebnissen ist die Tatsache, dass die inhibierenden Effekte von PEDF für die Rosettensphäroidstruktur (siehe Gliederungspunkt 4.1.3) durch GDNF aufgehoben werden können.

4.1.4 Die Bedeutung von GDNF, PEDF und BDNF für entwickelnde Photorezeptoren

Der Einfluss von verschiedenen neurotrophen Faktoren auf Proliferation, Differenzierung und neuronales Überleben, insbesondere von Photorezeptoren, konnte für die unterschiedlichsten Zellkultursysteme und aber auch *in vivo* nachgewiesen werden. Das Ziel in diesem Teil der Arbeit war die intensivere Untersuchung der Funktionen von GDNF, PEDF und BDNF für die sich entwickelnden Photorezeptoren im dreidimensionalen Rosettensphäroidsystem. Es

sollten der Effekt der Zugabe von exogenen GDNF, PEDF bzw. BDNF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren mittels Immunhistochemie untersucht werden, sowie des Weiteren mögliche Effekte auf der mRNA-Expressionsebene.

4.1.4.1 GDNF erhöht die Zellzahlen der Stäbchen, aber nicht der Zapfen

Rosettensphäroide wurden in Minimalmedium für 10 Tage kultiviert, als Kontrollkulturen in Abwesenheit von exogenen GDNF und unter Zugabe von 50 ng/ml GDNF. An den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 wurden Rosettensphäroide geerntet und für die Herstellung von Kryostatschnitten fixiert. Die Kryostatschnitte wurden einer Doppel-Immunfärbung unterzogen, in der die Stäbchen mit dem monoklonalen Stäbchenspezifischen Antikörper Rho4D2 und die roten und grünen Zapfen mit dem polyklonalen Zapfenspezifischen Antikörper CERN906 gefärbt wurden. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden zusätzlich die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

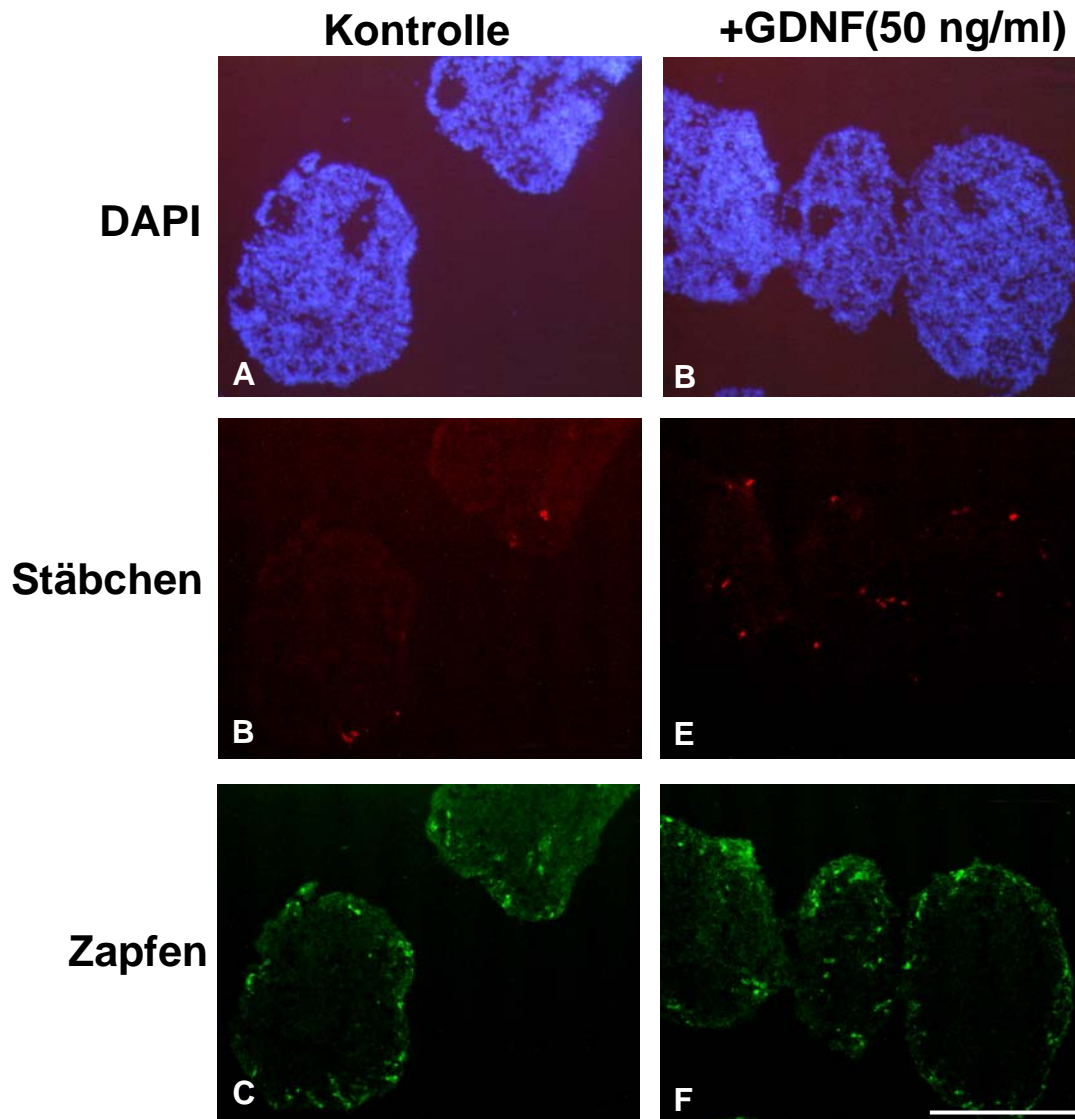


Abbildung 15. Der Effekt der Zugabe von exogenen GDNF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 4. Doppel-Immunfärbungen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 und dem Zapfen-spezifischen Antikörper CERN906 in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. **A:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids, der unter Kontrollbedingungen kultiviert wurde. **B:** Gezeigt ist die Immunfärbung eines Kontrollsphäroids, mit dem Antikörper Rho4D2, der spezifisch gegen Stäbchen gerichtet ist. **C:** Kontrollsphäroid, angefärbt mit CERN906, der spezifisch rote und grüne Zapfen färbt. **D:** DAPI-Zellkernfärbung eines mit exogenen GDNF behandelten Rosettensphäroid. **E:** Immunfärbung gegen Stäbchen in einem Rosettensphäroid, der mit GDNF behandelt wurde, zeigt im Vergleich zur Kontrolle wesentlich mehr detektierbare Stäbchen. **F:** Die Immunfärbung gegen rote und grüne Zapfen lässt, im Vergleich mit der Kontrolle, keine Unterschiede nach der Zugabe von GDNF in den Zellzahlen der Zapfen erkennen. Balken = 200 μ m.

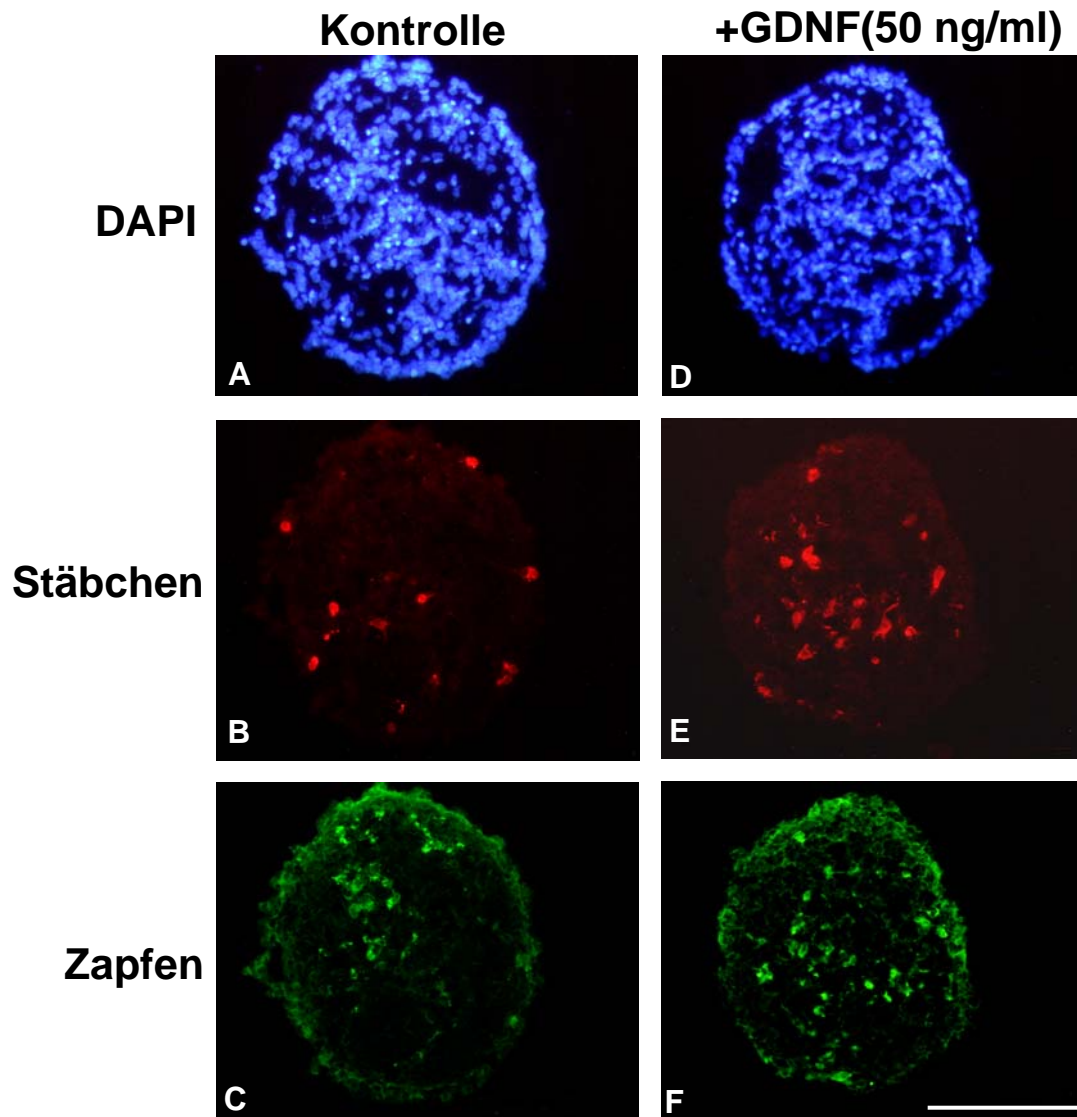
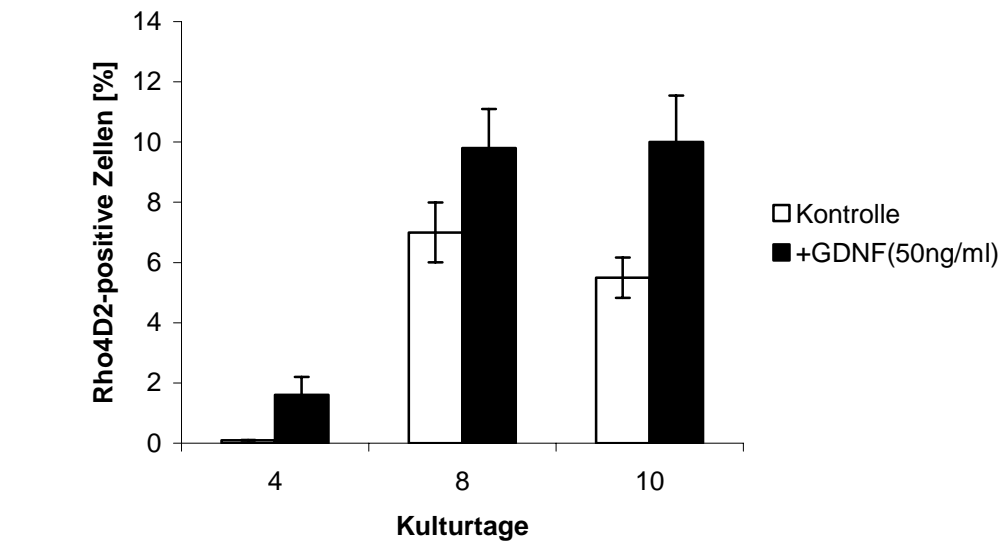
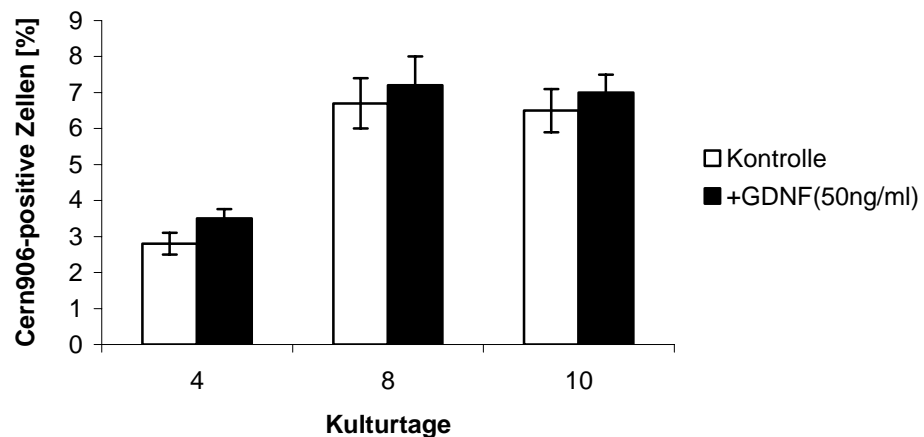


Abbildung 16. Der Effekt der Zugabe von exogenen GDNF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 10. Doppel-Immunfärbungen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 und dem Zapfen--spezifischen Antikörper CERN906 in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. **A:** Gezeigt ist ein Kontrollsphäroid, der mit DAPI angefärbt wurde. **B:** Immunfärbung gegen Stäbchen mit dem Stäbchenspezifischen Antikörper Rho4D2 in einem Kontrollsphäroid. **C:** Rosettensphäroid, der unter Kontrollbedingungen kultiviert wurde und mit CERN906 gefärbt wurde, der spezifisch gegen rote und grüne Zapfen gerichtet ist. **D:** DAPI-Zellkernfärbung eines mit exogenen GDNF behandelten Rosettensphäroid. **E:** Im Vergleich zur Kontrolle, zeigen Rosettensphäroide, die mit GDNF behandelt wurden, wesentlich mehr detektierbare Stäbchen als die Kontrollen, nach der Immunfärbung mit dem Stäbchenspezifischen Antikörper Rho4D2. **F:** Die Immunfärbung gegen rote und grüne Zapfen lässt, im Vergleich mit der Kontrolle, keine signifikanten Unterschiede nach der Zugabe von GDNF in den Zellzahlen der Zapfen erkennen. Balken = 100 µm.



A



B

Abbildung 17. Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von exogenen GDNF an den Kulturtagen 4, 8 und 10. A: Deutlich ist die signifikante Steigerung in den Zellzahlen der Stäbchen zu erkennen, nachdem Rosettensphäroide mit GDNF behandelt wurden. Besonders deutlich zeigt sich der Einfluss von GDNF an den Kulturtagen 4 und 10. **B:** Die Quantifizierung der Zellzahlen für rote und grüne Zapfen zeigt nur geringe Abweichungen in den Zellzahlen in Kontrollen und nach der Behandlung mit exogenen GDNF.

Die Doppel-Immunfärbung gegen Stäbchen und rote und grüne Zapfen zeigte vor allem für die Stäbchen große Effekte, ausgelöst durch GDNF. Deutlich konnten in den mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 gefärbten Rosettensphäroiden wesentlich mehr Stäbchen nachgewiesen werden, nachdem Rosettensphäroide mit der exogenen Zugabe von 50 ng/ml GDNF behandelt wurden. Die deutlichsten Effekte zeigten sich nach den Immunfärbungen an den Kulturtagen

4 (Abbildung 15E) und 10 (Abbildung 16E). Die Quantifizierung der Zellzahlen für die Stäbchen in Abbildung 17 unterstützen diese Ergebnisse. Besonders stark erwies sich der GDNF-Effekt an Kulturtag 4: Während in Kontrollen lediglich 0,1% Stäbchen nachgewiesen werden konnte, zeigten sich in den GDNF-behandelten Sphäroiden über 1,5% Stäbchen. Kontrollkulturen wiesen an Kulturtag 8 ca. 7% und an Kulturtag 10 noch 5% Rho4D2-positive Zellen auf. Demgegenüber konnten in behandelten Sphäroiden zu diesen beiden Kulturtagen über 9% Rho4D2-positive Zellen detektiert werden.

Die Effekte von GDNF auf die Zellzahlen der Zapfen sind nicht so deutlich: Während die Immunfärbungen in Abbildungen 15F und 16F keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, zeigten sich zwar in der Quantifizierung (Abbildung 17) leicht erhöhte Zellzahlen nach der Behandlung mit GDNF, doch betrugen diese Unterschiede lediglich ca. 0,5%. An Kulturtag 4 betrug der prozentuale Anteil der Zapfen zwischen 2, 8 und 3,4% und an Kulturtag 8 6,5 bis 7%. An Kulturtag 10 waren 6 bis 6,7% aller Zellen CERN906-positiv.

4.1.4.2 Exogenes GDNF erhöht signifikant die Rhodopsin mRNA-Expression

Die Ergebnisse in Gliederungspunkt 4.1.4.1 deuten auf einen starken Stäbchen-spezifischen Effekt von GDNF in Rosettensphäroiden hin. In diesem Abschnitt sollte nun der GDNF-Effekt auf der mRNA-Expressionsebene untersucht werden.

Es wurden Rosettensphäroide in Abwesenheit und in der Präsenz von 50 ng/ml GDNF über 10 Tage kultiviert. An den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 wurden Kulturen jeweils geerntet und für eine RNA-Isolierung bereitgehalten. Die wie in Gliederungspunkt 3.2.13 beschrieben isolierte RNA wurde in einer RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben, die wiederum als Ausgangsmaterial für eine semi-quantitative PCR diente. Die Amplifikate für GAPDH und Rhodopsin in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt.

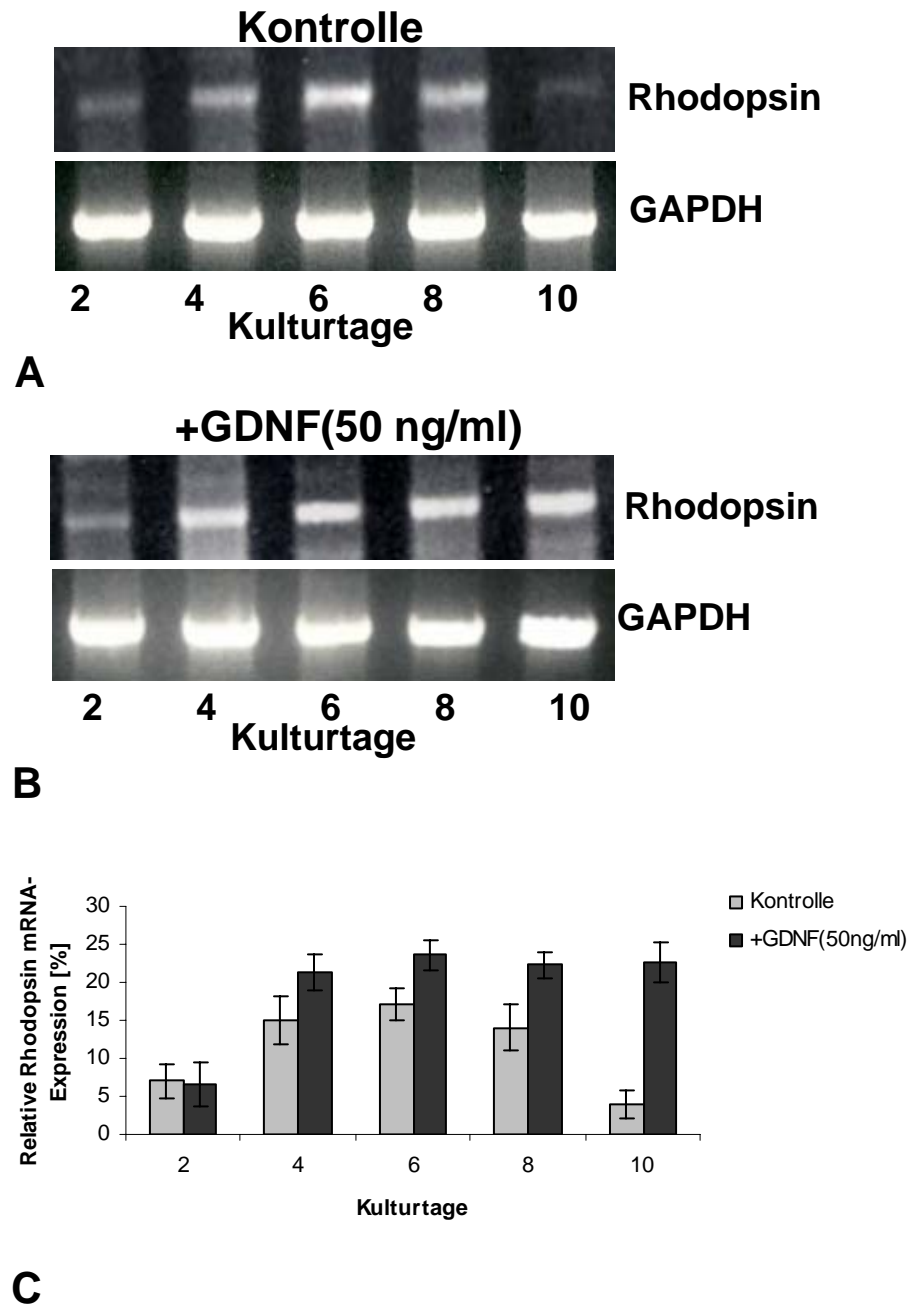
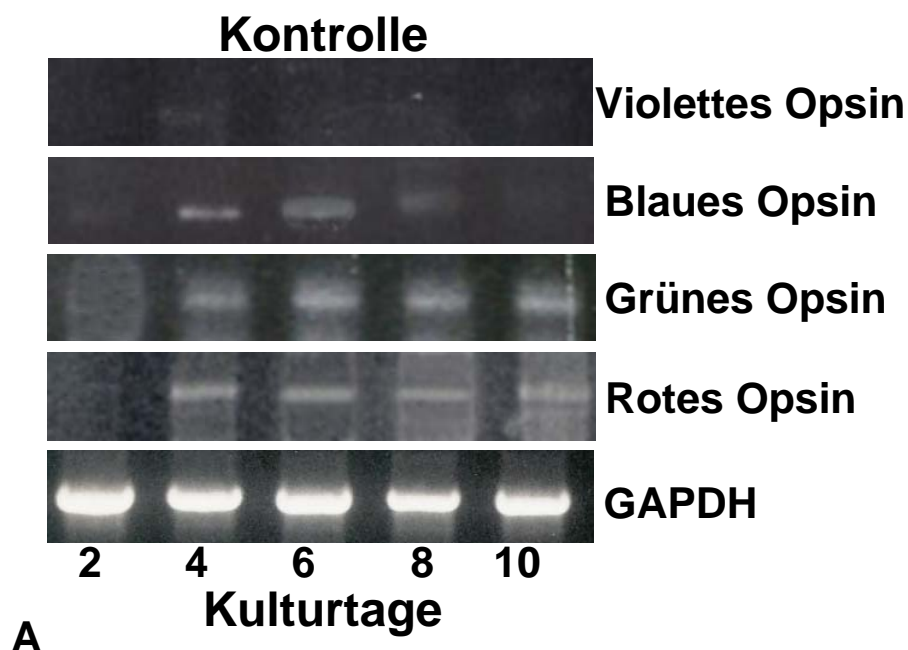


Abbildung 18. Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6 8 und 10. **A:** Gezeigt sind die aufgetrennten PCR-Produkte für Stäbchenrhodopsin und GAPDH in Rosettensphäroiden, die unter Kontrollbedingungen, d.h. in Minimalmedium, kultiviert wurden. **B:** Gezeigt sind die PCR-Produkte für Stäbchenrhodopsin und GAPDH nach der Zugabe von 50 ng/ml GDNF. **C:** Densitometrische Auswertung von (A) und (B). Der Wert für die GAPDH-Expression wurde zu den jeweiligen Kulturtagen gleich 100% gesetzt und die relative Expression von Stäbchenrhodopsin mRNA daraus ermittelt. Die densitometrische Quantifizierung zeigt einen graduellen Anstieg in der Expression von Rhodopsin mRNA von Kulturtag 2 bis Kulturtag 6. In den GDNF-behandelten Kulturen wird die Expressionsintensität an Kulturtag 6 über die verbleibende Kulturzeit beibehalten, während in Kontrollkulturen die Expression wieder abnimmt.

In Rosettensphäroidkulturen, die mit 50 ng/ml GDNF behandelt wurden, zeigte sich eine starke Stäbchenrhodopsin mRNA-Expression an den Kulturtagen 4 bis 10. Agarosegele mit den amplifizierten PCR-Produkten zeigten für Kontrollkulturen und für die GDNF-behandelten Rosettensphäroide einen Anstieg in der Expression bis zu Kulturtag 6 (Abbildung 18A, B). Während in Kontrollkulturen die Expressionsstärke dann wieder im gleichen Maße abnahm, wie sie zugenommen hatte, blieb die hohe Expressionsstärke nach der GDNF-Behandlung für die verbleibende Kultivierungsdauer erhalten. Die densitometrische Quantifizierung in Abbildung 18C verdeutlicht die beschriebenen Ergebnisse: Zu Beginn der Kultivierung betrug die Expressionsstärke noch 6% relative Rhodopsin mRNA-Expression, vergleichbar mit den Kontrollkulturen, die eine Expressionsstärke von 6,5% aufwiesen. In Kontrollen nahm die relative Rhodopsin mRNA-Expression bis zu Kulturtag 6 mit 17% zu, um wieder auf 4% an Kulturtag 10 abzusinken. Die Expressionsstärke an Kulturtag 6 von 22-24% in GDNF-behandelten Sphäroiden wurde über die verbleibende Kultivierungsdauer beibehalten.

4.1.4.3 Exogenes GDNF hat keinen Einfluss auf die Expression von Zapfen-Opsinen

Nach dem in Gliederungspunkt 4.1.4.1 keine signifikanten Effekte von GDNF auf die Zellzahlen der Zapfen immunhistochemisch gezeigt werden konnten, sollte nun ein möglicher Einfluss von GDNF auf der mRNA-Expressionsebene von roten, grünen, blauen und violetten Opsinen untersucht werden.



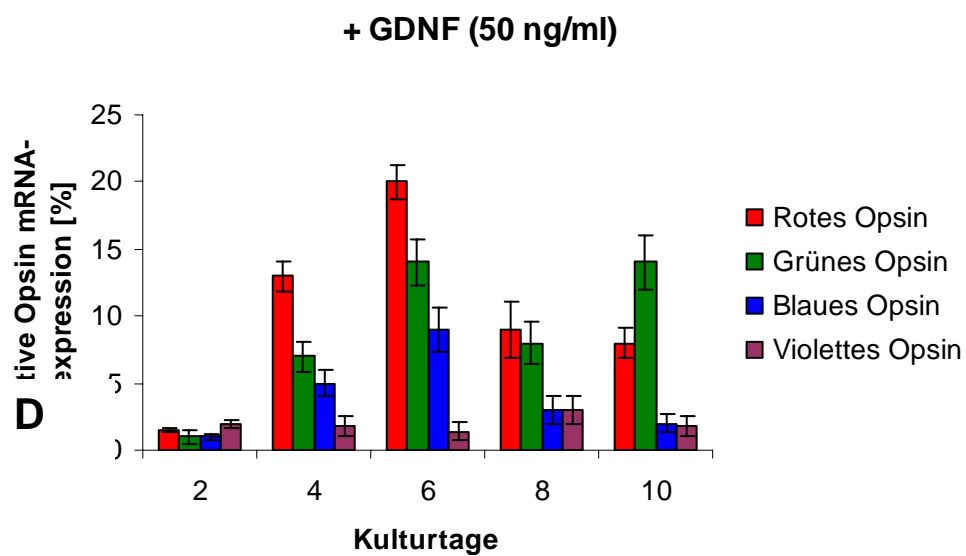
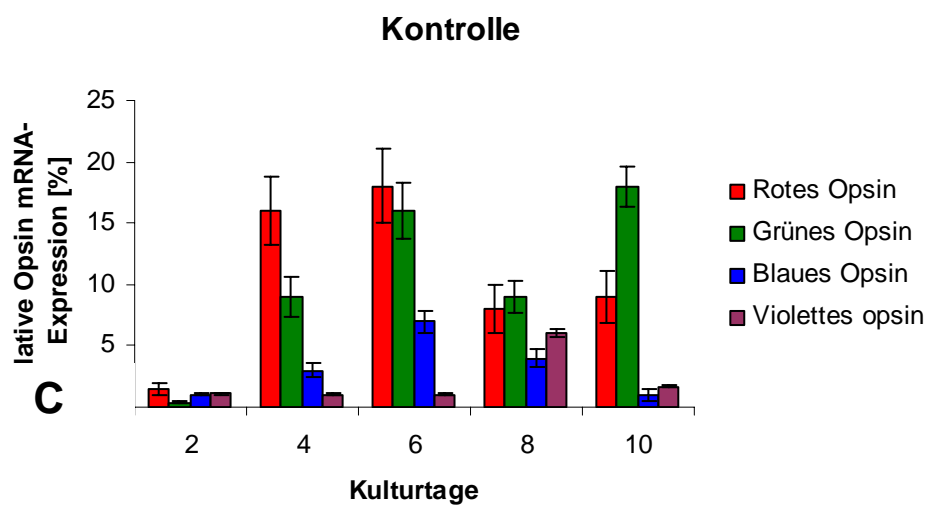
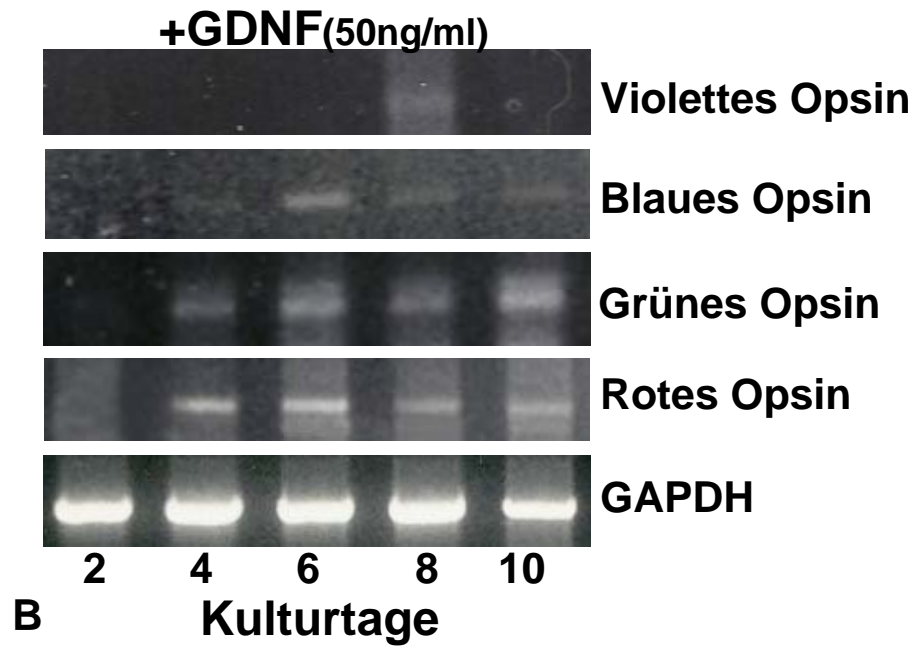


Abbildung 19. Temporale Expression der Zapfen-Opsine und von GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10. Gezeigt sind die aufgetrennten PCR-Produkte für rotes, grünes, blaues und violettes Opsin und GAPDH in Rosettensphäroiden, die unter Kontrollbedingungen, d.h. in Minimalmedium, kultiviert wurden. **B:** Gezeigt sind die PCR-Produkte für rotes, grünes, blaues und violettes Opsin und GAPDH nach der Zugabe von exogenen GDNF. **C:** Densitometrische Auswertungen von (A). **D:** Densitometrische Auswertung von (B). Der Wert für die GAPDH-Expression wurde zu jeweiligen Kulturtag gleich 100% gesetzt und die jeweilige relative Expression von Opsin mRNA daraus ermittelt. Die densitometrischen Quantifizierungen in (C) und (D) verdeutlichen, dass GDNF keinen Einfluss auf die Expression der einzelnen Zapfentypen aufweist.

Die Immunfärbungen in Gliederungspunkt 4.1.4.1 konnten keine signifikanten Effekte von GDNF für entwickelnde rote und grüne Zapfen in Rosettensphäroiden aufzeigen. Die semi-quantitative RT-PCR und die dazugehörigen Quantifizierungen in Abbildung 19 verfestigen den in Gliederungspunkt 4.1.4.1 gezeigten Stäbchen-spezifischen Einfluss von GDNF. Die Expressionsmuster der einzelnen analysierten Opsine (rotes, grünes, blaues und violettes Opsin), zeigten keine nennenswerten Unterschiede, nachdem Kulturen mit 50 ng/ml GDNF behandelt wurden. Durch GDNF ausgeübte Effekte auf Photorezeptoren in Rosettensphäroiden erweisen sich als Stäbchen-spezifisch; Zapfen werden durch GDNF nicht beeinflusst.

4.1.4.4 Exogenes PEDF zeigt dramatische Effekte für Zellzahlen von Stäbchen und Zapfen

Die Rolle für den neurotrophen Faktor PEDF für die sich entwickelnde Retina ist bisher noch nicht ganz geklärt. Deswegen sollte neben der Rolle für GDNF nun die Rolle für PEDF für sich entwickelnde retinale Zellen, insbesondere für Photorezeptoren, im dreidimensionalen Rosettensphäroidsystem untersucht werden. Wie für GDNF gezeigt, sollte in diesem Abschnitt der Arbeit zunächst mittels Immunfärbung mögliche Effekte, ausgelöst von PEDF, untersucht werden.

Es wurden Rosettensphäroide über 10 Tage kultiviert, zum einem unter Kontrollbedingungen, zum anderen unter der Zugabe von 50 ng/ml PEDF. Rosettensphäroidkulturen wurden an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 geerntet und für die Herstellung von Kryostatschnitten fixiert. Die Kryostatschnitte wurden wiederum einer Doppel-Immunfärbung unterzogen, wobei der Stäbchen-spezifische monoklonale Antikörper Rho4D2 eingesetzt wurde, sowie der polyklonale Antikörper CERN906, der gegen rote und grüne Zapfen gerichtet ist. Für eine spätere Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

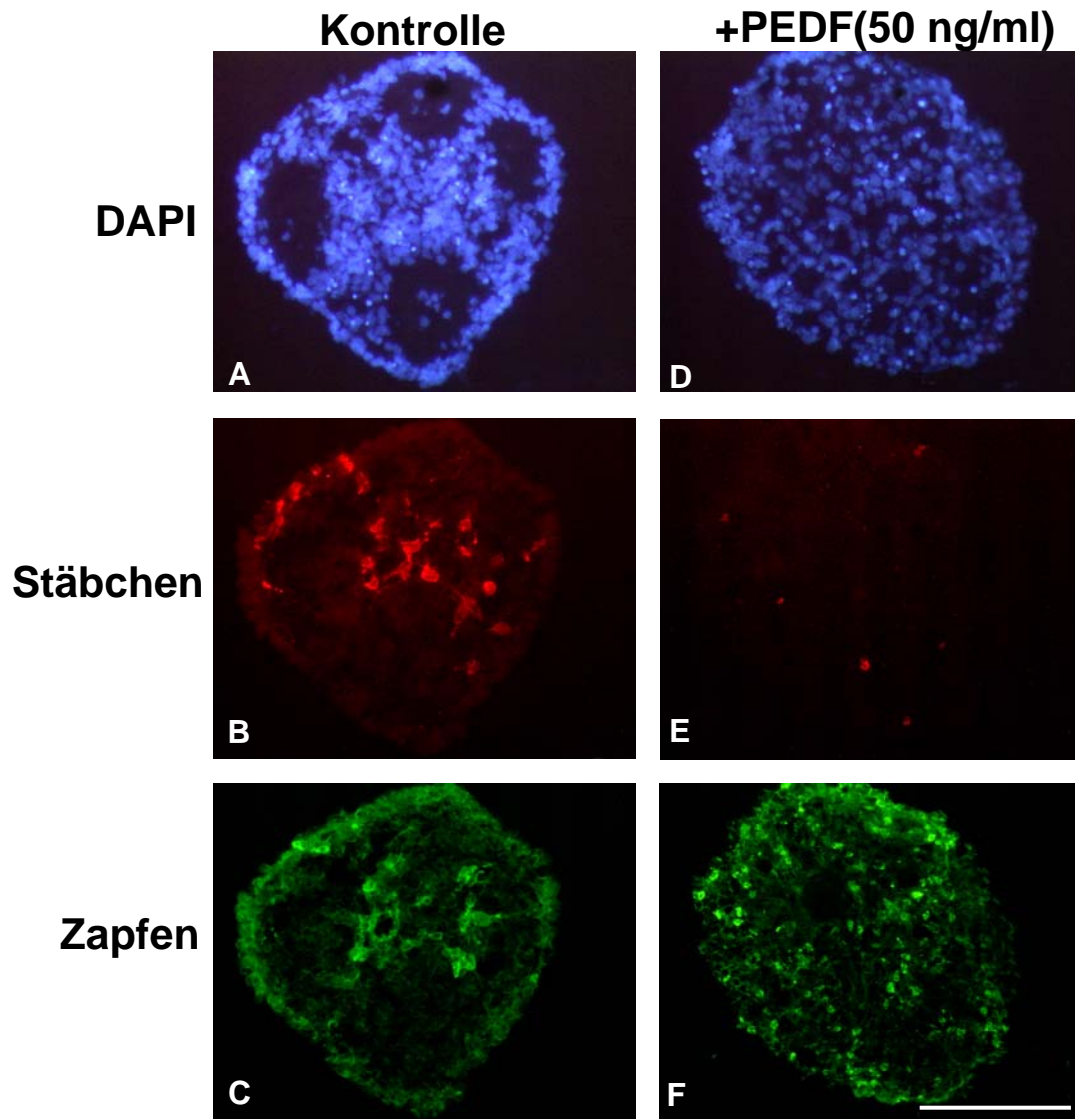


Abbildung 20. Der Effekt der Zugabe von exogenen PEDF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 8. Doppel-Immunfärbungen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 und dem Zapfen-spezifischen Antikörper CERN906 in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **A:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids, der unter Kontrollbedingungen kultiviert wurde. **B:** Gezeigt ist die Immunfärbung eines Kontrollsphäroids, mit dem Antikörper Rho4D2, der spezifisch gegen Stäbchen gerichtet ist. **C:** Kontrollsphäroid, gefärbt mit CERN906, der spezifisch rote und grüne Zapfen anfärbt. **D:** DAPI-Zellkernfärbung eines mit 50 ng/ml PEDF behandelten Rosettensphäroids. **E:** Immunfärbung gegen Stäbchen in einem Rosettensphäroid, der mit PEDF behandelt wurde, zeigt, im Vergleich zur Kontrolle, dass nur sehr wenige Rho4D2-positive Zellen detektiert werden konnten. **F:** Die Immunfärbung gegen rote und grüne Zapfen zeigt, verglichen mit der Kontrolle, wesentlich mehr CERN906 gefärbte Zellen nach der PEDF-Behandlung. Balken = 100 μ m.

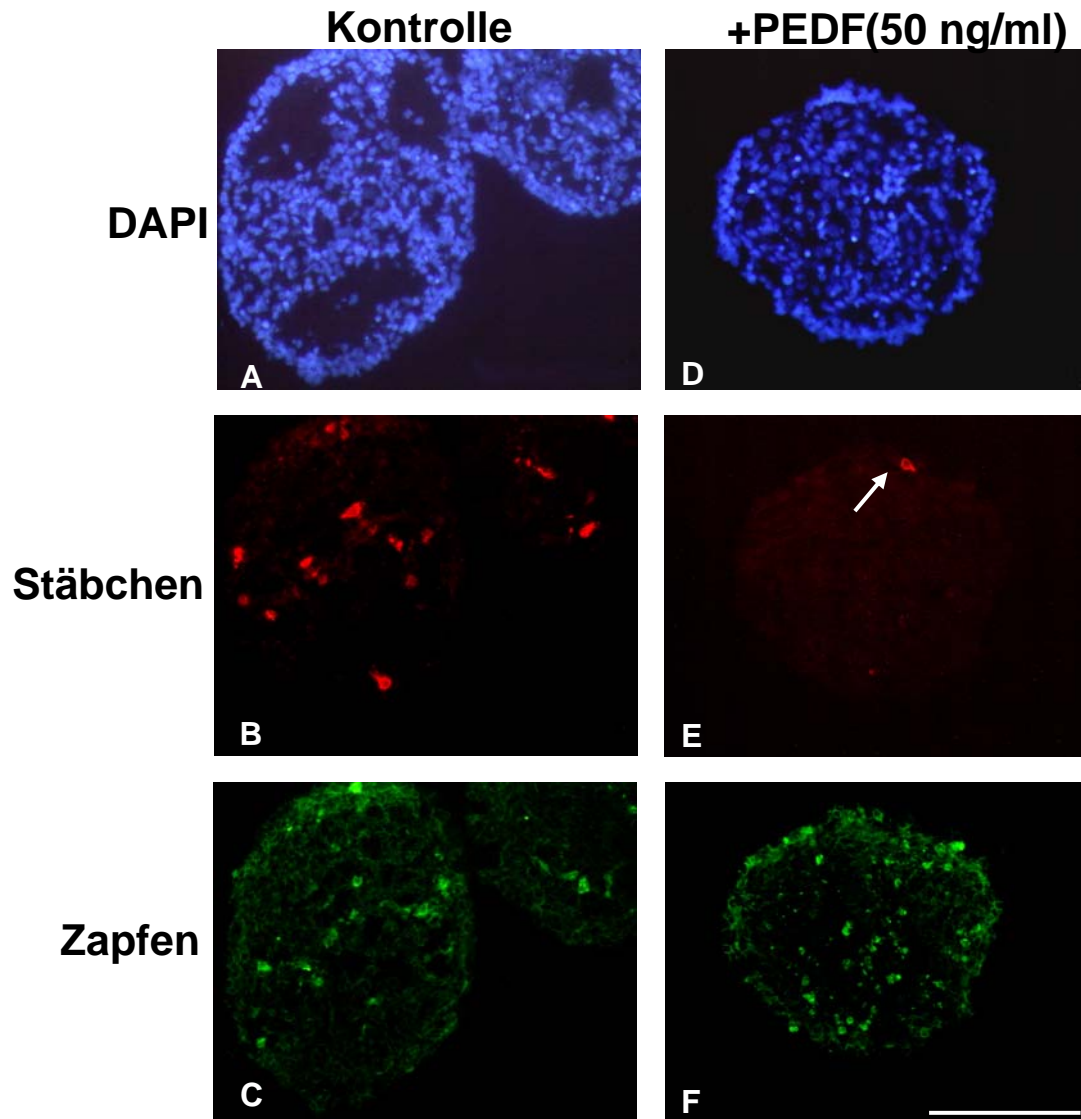


Abbildung 21. Der Effekt der Zugabe von exogenen PEDF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 10. Doppel-Immunfärbungen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 und dem Zapfen-spezifischen Antikörper CERN906 in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **A:** Gezeigt ist ein Kontrollsphäroid, der mit DAPI gefärbt wurde. **B:** Immunfärbung gegen Stäbchen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 in einem Kontrollsphäroid. **C:** Rosettensphäroid, der unter Kontrollbedingungen kultiviert und mit CERN906 gefärbt wurde, einem Antikörper, der spezifisch gegen rote und grüne Zapfen gerichtet ist. **D:** DAPI-Zellkernfärbung eines mit 50 ng/ml PEDF behandelten Rosettensphäroids. **E:** In diesem gezeigten Rosettensphäroid, der mit PEDF behandelt wurde, konnte zu diesem Zeitpunkt lediglich nur eine Rho4D2-positive Zelle nachgewiesen werden (Pfeil). **F:** Die Immunfärbung gegen rote und grüne Zapfen nach der Zugabe von PEDF, zeigt, im Vergleich mit der Kontrolle, vermehrt CER906-positive Zellen. = 100 µm.

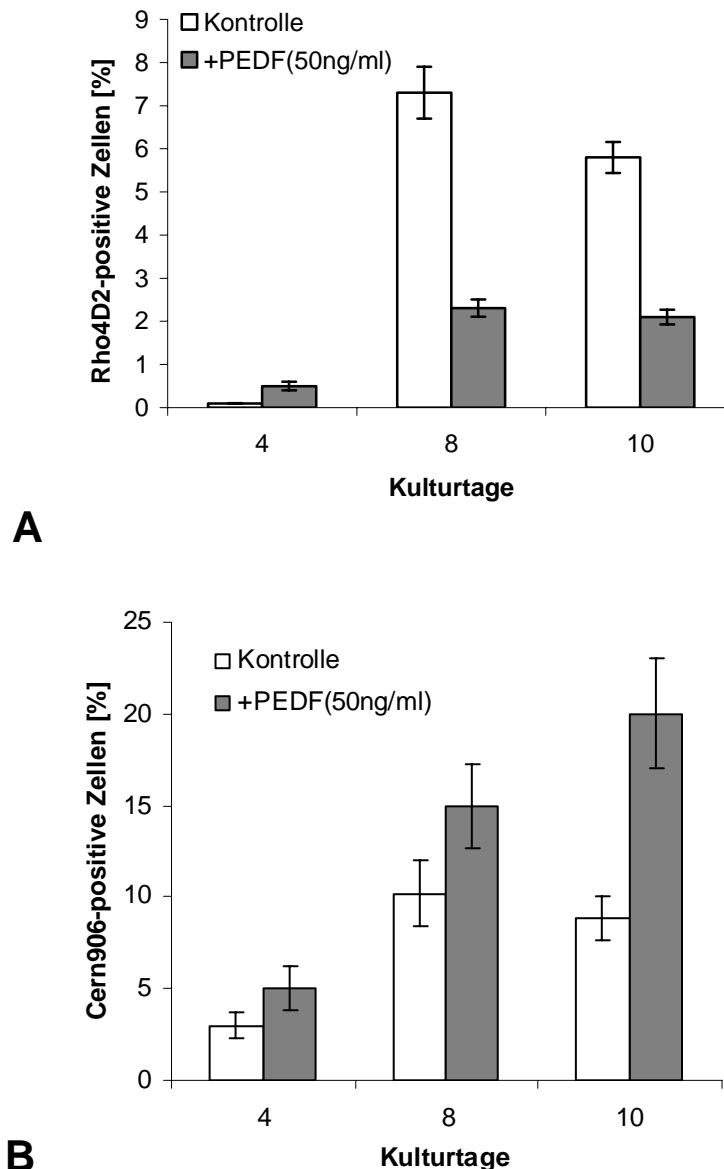


Abbildung 22. Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von PEDF an den Kulturtagen 4, 8 und 10. **A:** Der erste untersuchte Kulturtag 4 zeigt eine Erhöhung in den Zellzahlen der Stäbchen in PEDF-behandelten Sphäroiden. In den folgenden Kulturtagen 8 und 10 setzt eine dramatische Minderung in den Zellzahlen der Stäbchen ein, nachdem Rosettensphäroide mit PEDF behandelt wurden. **B:** Die Quantifizierung der Zellzahlen für rote und grüne Zapfen zeigt nach der Zugabe von PEDF deutlich erhöhte Zellzahlen. Überdies hinaus nahmen die Zellzahlen graduell zu, während in Kontrollen die meisten CERN906-positive Zellen an Kulturtag 8 detektiert wurden.

Die Ergebnisse demonstrierten für PEDF einen starken Einfluss auf die sich entwickelnden Photorezeptoren im Rosettensphäroidkultursystem. Anders als bei der Behandlung mit GDNF, waren sowohl Stäbchen, als auch rote und grüne Zapfen betroffen. Besonders dramatisch zeigte sich der PEDF-Effekt auf die Stäbchen, der

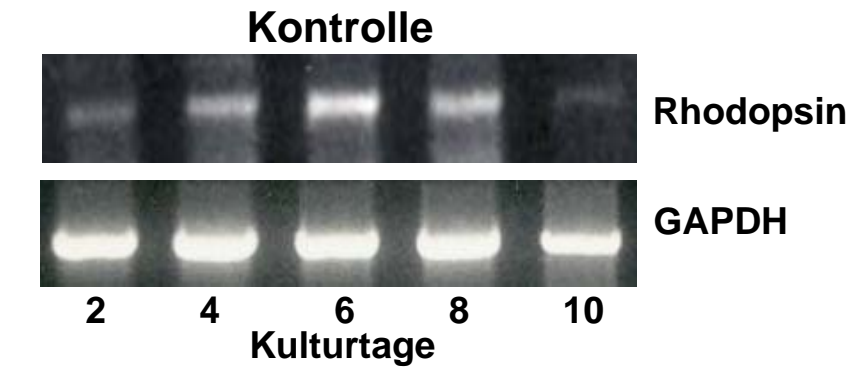
vor allem durch die Quantifizierung in Abbildung 22 zum Ausdruck kommt. Am ersten untersuchten Kulturtag 4, konnte eine Steigerung gegenüber den Kontrollen von 0,3% in den Zellzahlen der Rho4D2-positiven Zellen in den PEDF-behandelten Kulturen nachgewiesen werden. An den folgenden untersuchten Kulturtagen änderte sich jedoch die Situation dramatisch: An den Kulturtagen 8 und 10 konnte lediglich ein Drittel der in den Kontrollen nachgewiesenen Rho4D2-positiven Zellen detektiert werden, nachdem Kulturen mit PEDF behandelt worden waren. Der prozentuale Anteil der Stäbchen betrug in den Kontrollkulturen zu den Kulturtagen 8 ca. 7,4% und an Kulturtag 10 noch 5,8%. Die PEDF-behandelten Kulturen wiesen nicht mehr als 2,5% (Kulturtag 8) Rho4D2-positive Zellen auf.

Im Kontrast dazu steht die Situation der roten und grünen Zapfen: Die Zugabe von exogenen PEDF führte zu einem graduellen Anstieg in den Zellzahlen der Zapfen. Der prozentuale Anteil erreichte 5% an Kulturtag 4 und stieg auf 20% an Kulturtag 10 an. Die Kontrollen erreichten 3% zu Beginn der Untersuchung an Kulturtag 4 und mit 10% an Kulturtag 8 ihr Maximum im prozentualen Anteil der Zapfen. An Kulturtag 10 konnten nur noch 8% aller Zellen als CERN906-positiv identifiziert werden.

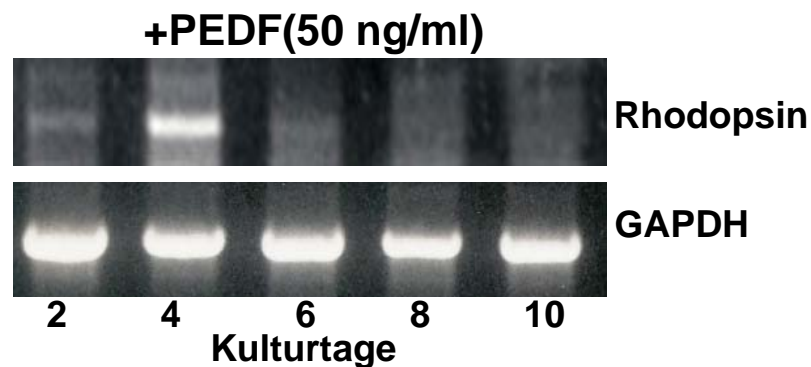
4.1.4.5 Exogenes PEDF führt zu zwei gegensätzlichen Effekten für das Expressionsmuster von Stäbchenrhodopsin

Anders als GDNF, zeigte PEDF im Gliederungspunkt 4.1.4.4 starke Effekte auf die Zellzahlen der Stäbchen und der roten und grünen Zapfen. Nun sollte geklärt werden, ob sich diese Effekte auch auf der mRNA-Expressionsebene nachvollziehen lassen.

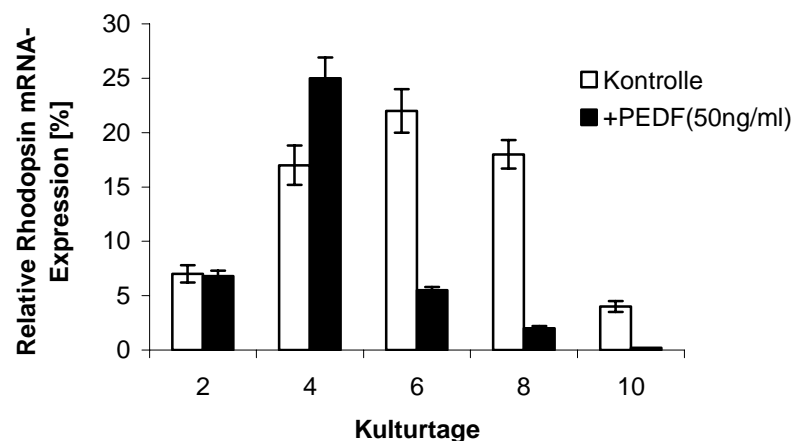
Es wurden Rosettensphäroide in Abwesenheit und in der Gegenwart von 50 ng/ml PEDF über 10 Tage kultiviert. An den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 wurden Kulturen jeweils geerntet. Aus den geernteten Kulturen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als *template* für eine semi-quantitative PCR, in der PCR-Produkte für GAPDH und Stäbchenrhodopsin amplifiziert wurden. Das Ergebnis zeigt die aufgetrennten Amplifikate für GAPDH und Stäbchenrhodopsin in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10.



A



B



C

Abbildung 23. Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6 8 und 10. A: Gezeigt sind die aufgetrennten PCR-Produkte für Stäbchenrhodopsin und GAPDH in Rosettensphäroiden, die unter Kontrollbedingungen, d.h. in Minimalmedium, kultiviert wurden. **B:** Gezeigt sind die PCR-Produkte für Stäbchenrhodopsin und GAPDH nach der exogenen Zugabe von PEDF. **C:** Densitometrische Auswertung von (A) und (B). Der Wert für die GAPDH-Expression wurde zu dem jeweiligen Kulturtag gleich 100% gesetzt und die relative Expression von Stäbchenrhodopsin mRNA daraus ermittelt. Die densitometrische Quantifizierung der Kontrollkulturen zeigt einen graduellen Anstieg in der Expression von Rhodopsin mRNA von Kulturtag

2 bis zu Kulturtag 6, welche dann bis Kulturtag 10 im selben Maß wieder abnimmt. Die Expressionsintensität nach der PEDF-Behandlung ist an Kulturtag 4 höher als in den Kontrollen und erreicht damit ihr Maximum. An Kulturtag 6 fällt die Expressionsstärke wieder dramatisch ab.

Die Ergebnisse für die Analyse der mRNA-Expressionsmuster für Stäbchenrhodopsin in behandelten und unbehandelten Kulturen unterstützen die in Gliederungspunkt 4.1.4.4 beschriebenen Ergebnisse der Ermittlung der Zellzahlen für Stäbchen. Die zwei entgegen gesetzten Effekte von PEDF während der Kulturperiode werden durch die densitometrische Quantifizierung in Abbildung 23 hervorgehoben. Die Behandlung mit PEDF führte dazu, dass an Kulturtag 4 die Rhodopsin mRNA-Expression auf ein Maximum von 25% relative Expression anstieg. Doch an Kulturtag 6 fiel diese hohe Expression dramatisch ab (5%), um bis zum Kulturtag 10 weiter auf lediglich 0,2% abzusinken. Die Kontrollen zeigten im Gegenzug einen graduellen Anstieg bis Kulturtag 6 (22%) und einen graduellen Abstieg bis Kulturtag 10 (3%).

4.1.4.6 Die Zugabe von exogenen PEDF führt zu einem signifikanten Anstieg in der Opsin-Expression

Das Expressionsmuster für Stäbchenrhodopsin zeigte zwei unterschiedliche Effekte von PEDF, bezogen auf einen frühen Einfluss und auf einen Einfluss zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt. Die Effekte auf die unterschiedlichen Zapfentypen sollten nun im Einzelnen geklärt werden.

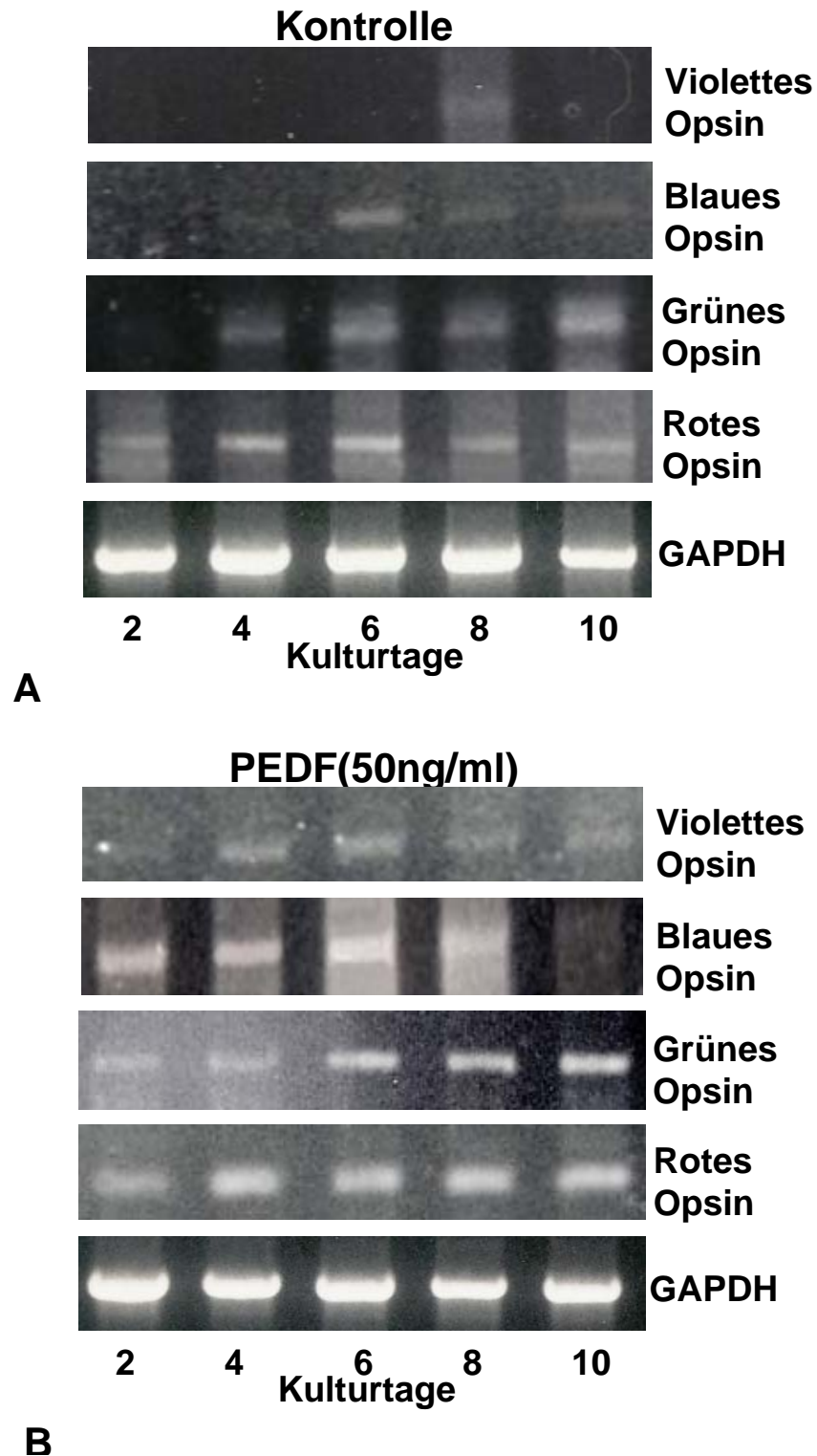


Abbildung 24. Temporale Expression der einzelnen Opsine und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10. Gezeigt sind die aufgetrennten PCR-Produkte für rotes, grünes, blaues und violettes Opsin und GAPDH in Rosettensphäroiden, die unter Kontrollbedingungen, d.h. in Minimalmedium, kultiviert wurden. **B:** Gezeigt sind die PCR-Produkte für rotes, grünes, blaues und violettes Opsin und GAPDH nach der Zugabe von exogenen PEDF.

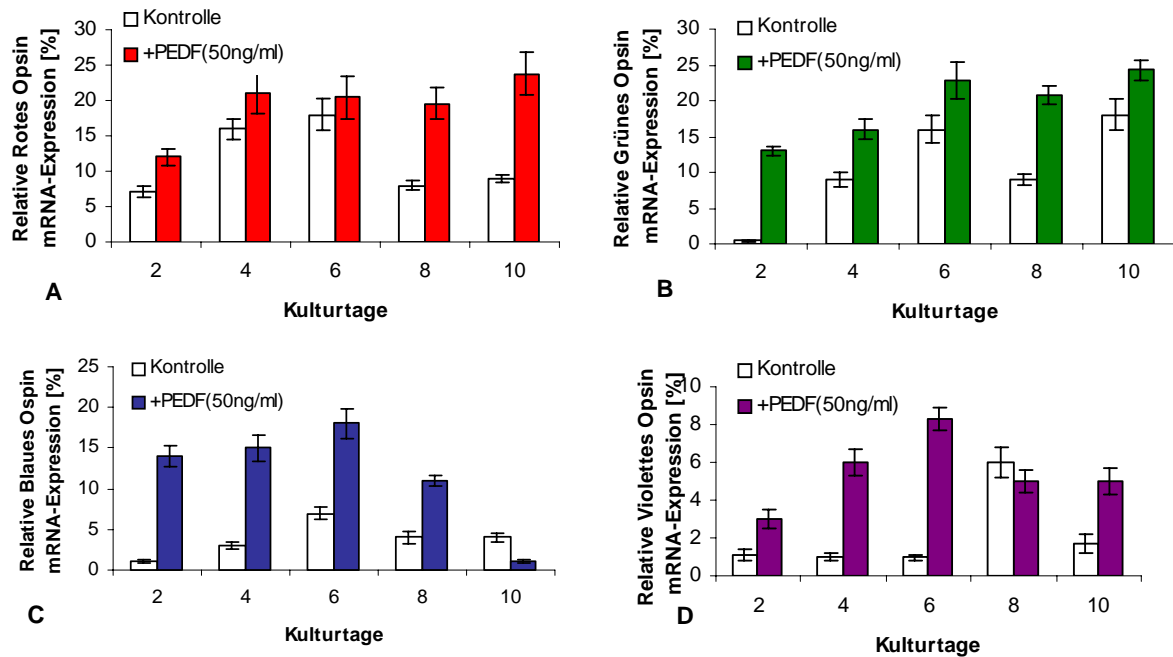


Abbildung 25. Densitometrische Quantifizierung der Zapfen-Opsine und GAPDH mRNA-Expression in unbehandelten und PEDF-behandelten Sphäroiden. Der Wert für die GAPDH-Expression wurde zu jeweiligen Kulturtag gleich 100% gesetzt und die jeweilige relative Expression von Opsin mRNA daraus ermittelt. **A:** Densitometrische Quantifizierung für rotes Opsin in behandelten und unbehandelten Kulturen. Während in Kontrollen die Expression graduell ansteigt und wieder absteigt, bleibt sie nach PEDF-Behandlung ab Kulturtag 4 für die verbleibende Kultivierungsdauer erhalten. **B:** Die densitometrische Auswertung für das grüne Opsin zeigt ein variierendes Expressionsmuster für Kontrollen und behandelte Kulturen, jedoch, ist die Expressionsintensität nach der Zugabe von PEDF signifikant erhöht. **C:** Die densitometrische Auswertung von blauen Opsin zeigt einen graduellen Anstieg und Abstieg in der Expression in Kontrollkulturen. Die Expression in PEDF-behandelten Kulturen erreicht im Vergleich zu den Kontrollen gleich zu Beginn eine extrem erhöhte, gleich bleibende Expressionsrate, die erst ab Kulturtag 8 wieder abfällt. **D:** Die densitometrische Auswertung von violetten Opsin zeigt für Kontrollkulturen ein sehr variierendes Expressionsmuster, mit einem sehr hohen Maximum an Kulturtag 8. Die PEDF-behandelten Kulturen zeigen eine graduell ansteigende, starke Expression bis Kulturtag 6, die an den folgenden Kulturtagen wieder abschwächt.

Die semi-quantitative RT-PCR enthüllte für die einzelnen Opsine ganz unterschiedliche Expressionsmuster, nachdem Rosettensphäroide mit 50 ng/ml PEDF behandelt wurden. Insgesamt zeigte sich, insbesondere durch die densitometrische Quantifizierung in Abbildung 15, dass alle Opsine stärker exprimiert werden, wenn PEDF zugegen ist.

Der Einfluss von PEDF wird vor allem bei der Betrachtung des Expressionsmuster von roten Opsin in Abbildung 25A deutlich: Während die Expression in den Kontrollkulturen zunächst graduell anstieg und dann wieder ab Kulturtag 6 abfiel, blieb eine hohe rote Opsin-Expression in den PEDF-Kulturen von Kulturtag 4 an über die verbleibende Kultivierungsdauer erhalten. Schließlich erreichte die Expression an Kulturtag 10 ihr Maximum mit 23%, während Kontrollkulturen zu diesem Zeitpunkt eine relative mRNA-Expression von lediglich 7,5% aufwiesen.

Das Expressionsmuster für grünes Opsin in Abbildung 25B zeigte sich in Kontrollen und behandelten Kulturen ähnlich variierend. Doch war die Expression im Vergleich mit den Kontrollen nach der PEDF-Zugabe um mindestens ein Drittel in der Expressionsstärke erhöht. Auffallend war in den PEDF-Kulturen eine sehr starke Anfangsexpression am Kulturtag 2 (12,5%), während in den Kontrollen lediglich 1% relative mRNA-Expression für grünes Opsin nachgewiesen wurde.

Das Expressionsmuster für blaues Opsin (Abbildung 25C) in Kontrollen stieg graduell bis Kulturtag 6 an und fiel dann wieder bis zu Kulturtag 10 ab. Das Maximum wurde an Kulturtag 6 mit 6,5% erreicht. Die Expression in den PEDF-behandelten Kulturen stieg zwar auch bis K6 (22%) an, doch war an Kulturtag 2 schon eine sehr hohe Expression von 14% zu detektieren. An Kulturtag 8 konnte wieder eine Abnahme der Expression nachgewiesen werden. An Kulturtag 10 wurde eine relative Expression von lediglich 2% erreicht, während in Kontrollen noch eine Expression von 4% vorlag.

Das Expressionsmuster für violettes Opsin in Abbildung 25D zeigte einen graduellen Anstieg in der Expression nach der PEDF-Behandlung: Nach dem Maximum an Kulturtag 6 (8%), sank die Expression wieder ab. In Kontrollen ließ sich nur eine geringe Expression zu Beginn der Kultivierung aufweisen (2-3%), die bis zum Kulturtag 6 zunahm. Dann trat ein Wechsel in der Expression ein: In Kontrollen stieg die Expressionsintensität sprunghaft auf nahezu 6% an, während in PEDF-behandelten Kulturen nur eine Expression von 5% nachgewiesen werden konnte. An Kulturtag 10 war das Verhältnis wieder gedreht: PEDF-Kulturen wiesen eine Expression von 5% auf und Kontrollen eine relative mRNA-Expression von 1,5%.

4.1.4.7 BDNF zeigt keine signifikanten Effekte für Stäbchen und Zapfen

Nach den sehr deutlichen Effekten für die Photorezeptoren, ausgelöst durch GDNF und PEDF, stellte sich die Frage, welche Effekte hat BDNF für die sich entwickelnden Photorezeptoren. Erneut wurden Rosettensphäroide unter Kontrollbedingungen und unter der Zugabe von 10 ng/ml BDNF über 10 Tage kultiviert. Aus den zu den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 geernteten Kulturen wurden Kryostatschnitte angefertigt, die wieder einer Doppel-Immunfärbung mit Rho4D2 und CERN906 unterzogen wurden. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

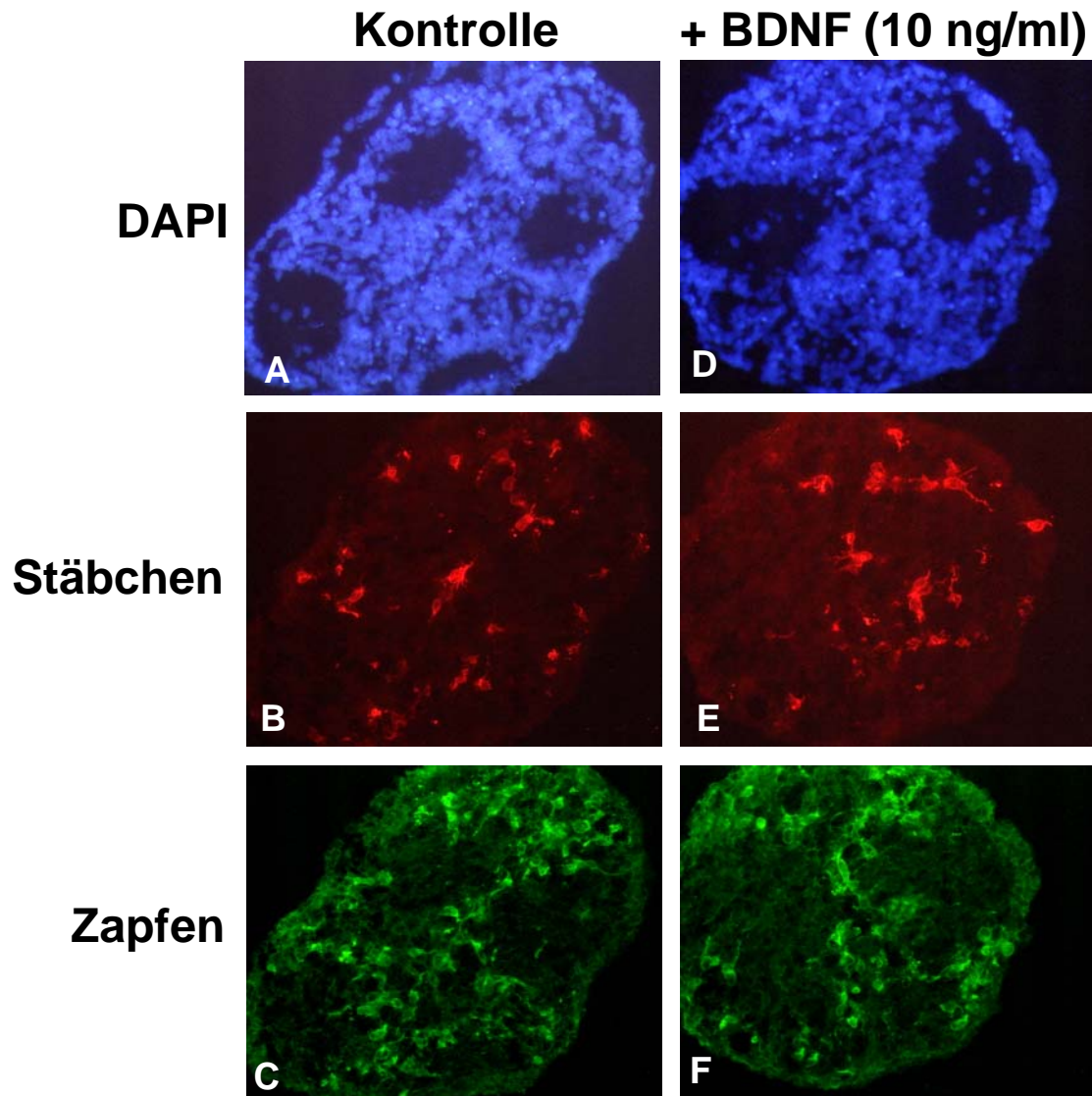


Abbildung 26. Der Effekt der Zugabe von exogenen BDNF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 8. Doppel-Immunfärbungen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 und dem Zapfen-spezifischen Antikörper CERN906 in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **A:** Gezeigt ist ein Kontrollsphäroid, der mit DAPI gefärbt wurde. **B:** Immunfärbung gegen Stäbchen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 in einem Kontrollsphäroid. **C:** Rosettensphäroid, der unter Kontrollbedingungen kultiviert und mit CERN906 gefärbt wurde, einem Antikörper, der spezifisch gegen rote und grüne Zapfen gerichtet ist. **D:** DAPI-Zellkernfärbung eines mit 10 ng/ml BDNF behandelten Rosettensphäroids. **E:** Gezeigt ist ein Rosettensphäroid, der mit BDNF behandelt wurde. **F:** Die Immunfärbung gegen rote und grüne Zapfen nach der Zugabe von BDNF. Im Vergleich mit den Kontrollen zeigen sich keine Unterschiede in den Zellzahlen der Rho4D2-positive-Zellen, sowie der CERN906-positiven Zellen. = 100µm.

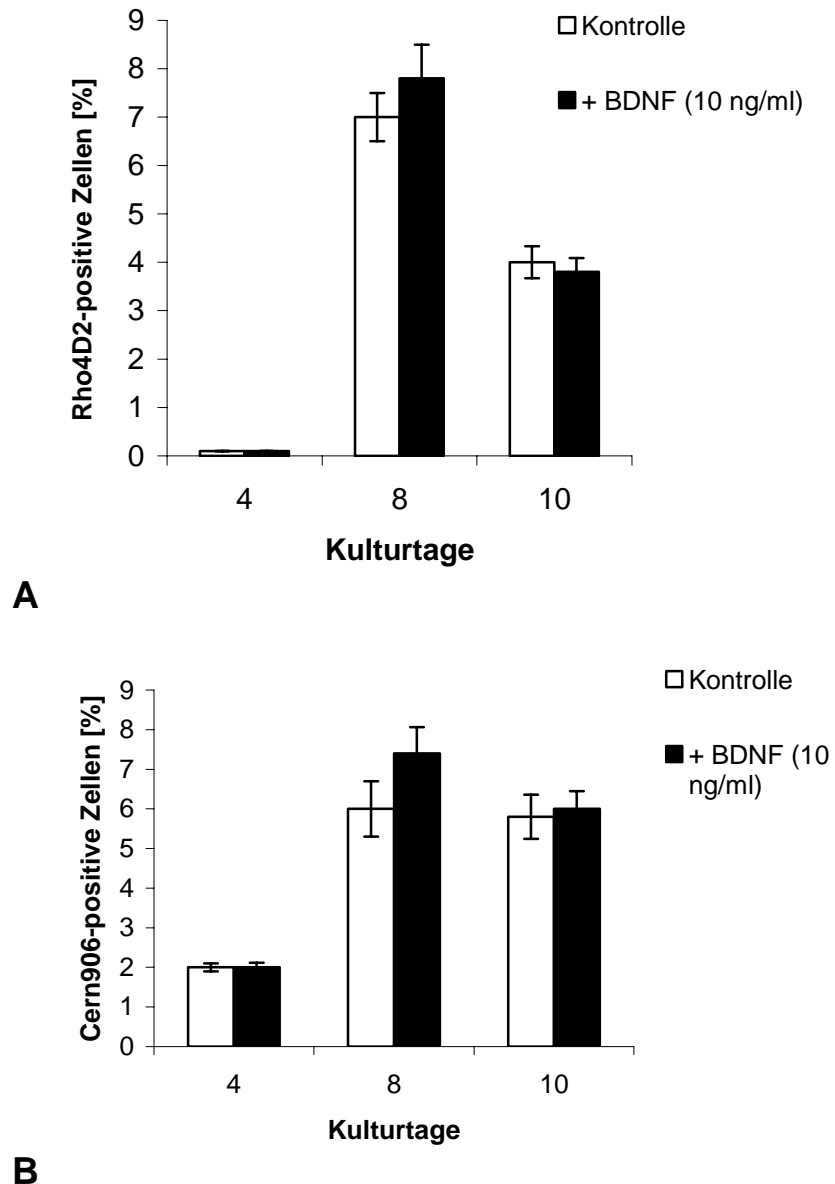


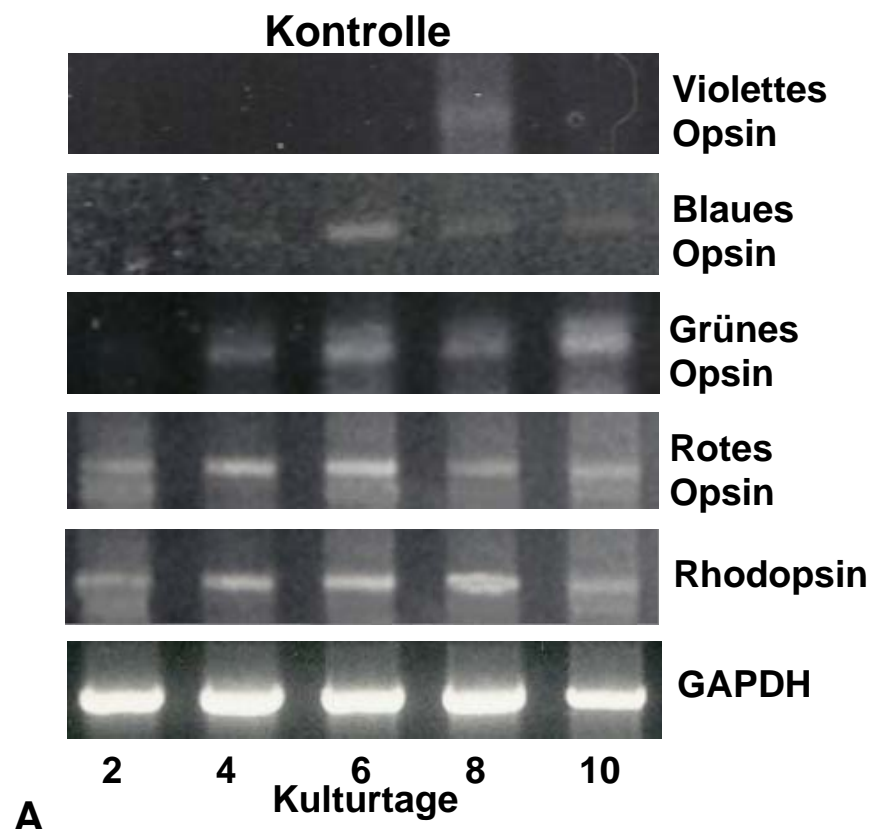
Abbildung 27. Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von exogenen BDNF. A: Die Behandlung der Rosettensphäroide mit 10 ng/ml BDNF führt zu keinen signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen für Rho4D2-positiven Zellen. **B:** Ebenfalls die Detektion der CERN906-positiven Zellen zeigt keinen nennenswerten Einfluss, ausgelöst durch BDNF.

Die Immunfärbungen der Photorezeptoren in Kontrollen und nach der Behandlung mit 10 ng/ml BDNF führte zu keinen signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen der Stäbchen und der roten und grünen Zapfen. Die Quantifizierung wies unter beiden Kulturbedingungen ein jeweiliges Maximum der Zellzahlen für beide Photorezeptortypen an Kulturtag 8 auf.

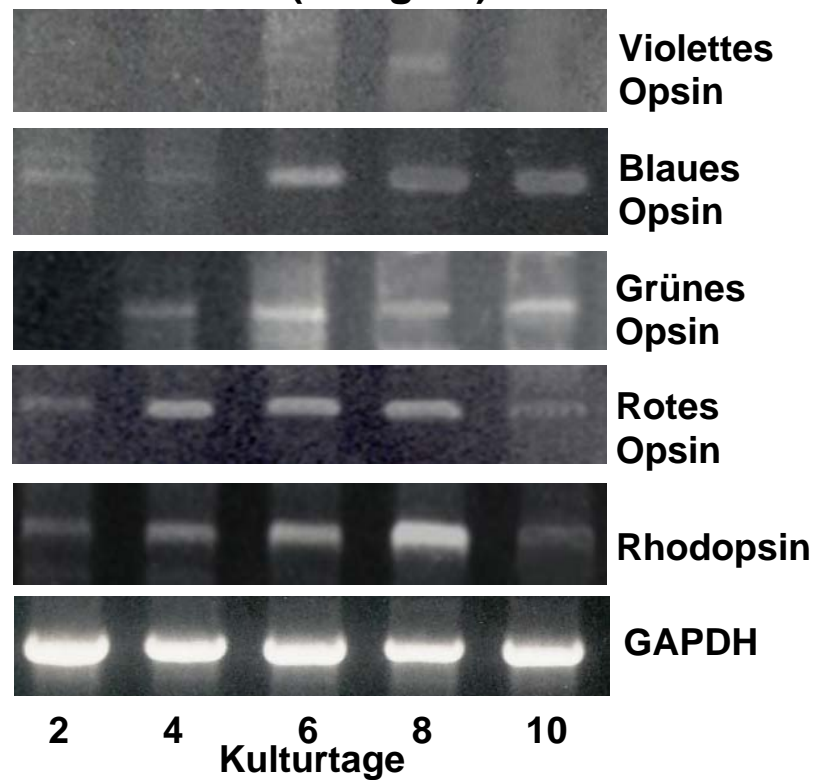
4.1.4.8 Einen Einfluss von BDNF auf Photorezeptoren kann auch auf der mRNA-Expressionsebene nicht nachgewiesen werden

Nach dem in Gliederungspunkt 4.1.4.7 die Immunfärbungen gegen Stäbchen und rote und grüne Zapfen keinen signifikanten Effekt, aufgrund der Behandlung von BDNF, aufdeckten, sollte nun die Situation auf der mRNA-Expressionsebene aufgeklärt werden.

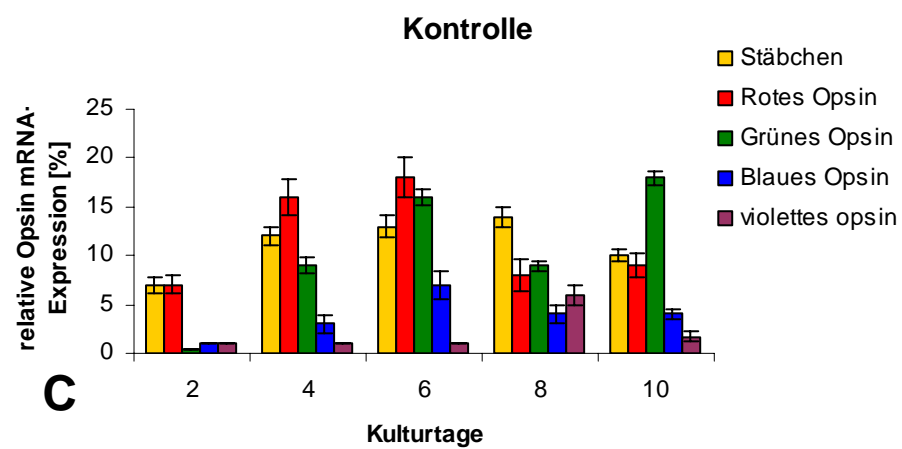
Es wurden Rosettensphäroide in Abwesenheit und in der Gegenwart von 10 ng/ml BDNF über 10 Tage kultiviert. An den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 wurden Kulturen jeweils geerntet. Aus den geernteten Kulturen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als *template* für eine semi-quantitative PCR, in der PCR-Produkte für GAPDH und Stäbchenrhodopsin amplifiziert wurden. Das Ergebnis zeigt die aufgetrennten Amplifikate für GAPDH und Stäbchenrhodopsin in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden zu den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10.



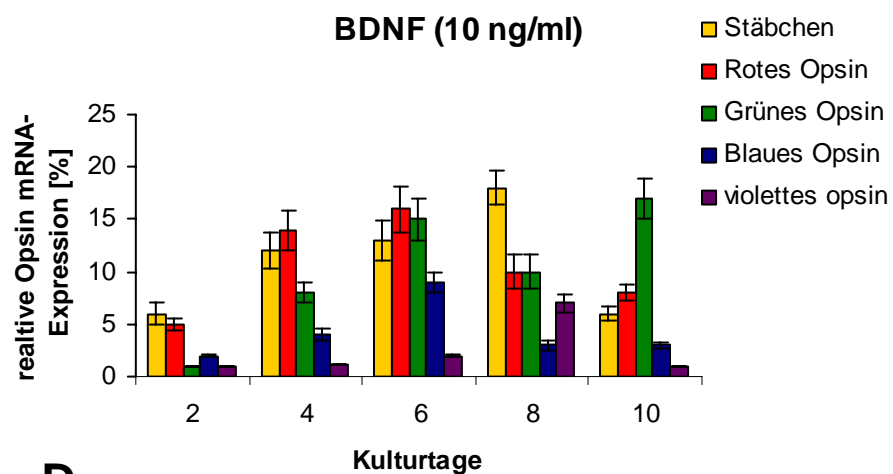
+ BDNF (10 ng/ml)



B



C



D

Abbildung 29. Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin, der Zapfen-Opsine und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10. Gezeigt sind die aufgetrennten PCR-Produkte für Stäbchen-Rhodopsin, rotes, grünes, blaues und violettes Opsin und GAPDH in Rosettensphäroiden, die unter Kontrollbedingungen, d.h. in Minimalmedium, kultiviert wurden. **B:** Gezeigt sind die PCR-Produkte für Stäbchen-Rhodopsin, rotes, grünes, blaues und violettes Opsin und GAPDH nach der Zugabe von exogenen BDNF. **C:** Densitometrische Auswertungen von (A). **D:** Densitometrische Auswertung von (B). Der Wert für die GAPDH-Expression wurde zu jeweiligen Kulturtag gleich 100% gesetzt und die jeweilige relative Expression von Opsin mRNA daraus ermittelt. Die densitometrischen Quantifizierungen in (C) und (D) verdeutlichen, dass BDNF keinen Einfluss auf die Expression von Stäbchen-Rhodopsin, sowie auf die einzelnen Opsine, ausübt.

Die Immunfärbungen in Gliederungspunkt 4.1.4.7 konnten keinen signifikanten Effekt von BDNF für entwickelnde Photorezeptoren in Rosettensphäroiden aufzeigen. Die semi-quantitative RT-PCR und die dazugehörigen Quantifizierungen in Abbildung 29 verfestigen das in Gliederungspunkt 4.1.4.7 gezeigte Bild. Weder das Expressionsmuster für Stäbchen-Rhodopsin, noch das Expressionsmuster für rotes, grünes, blaues und violettes Opsin, zeigte keine nennenswerten Unterschiede, nach dem Kulturen mit 10 ng/ml BDNF behandelt wurden. Die Resultate der immunhistochemischen Färbungen, sowie der Analyse auf der mRNA-Expressionsebene, können keinen Effekt von BDNF auf entwickelnde Photorezeptoren beweisen.

4.1.4.9 Die Effekte von GDNF werden durch BDNF potenziert

In Gliederungspunkt 4.1.4.1 wurde gezeigt, dass GDNF sich vor allem auf die Stäbchen auswirkt. Experimente, in denen BDNF zu Rosettenkulturen gegeben wurde, zeigten weder für Stäbchen, noch für Zapfen, signifikante Unterschiede. In diesem Abschnitt sollte nun geklärt werden, ob aber die Kombination aus GDNF und BDNF einen Effekt auf sich entwickelnde Photorezeptoren in Rosettenkulturen hat.

Es wurden erneut Rosettensphäroide angezüchtet, die zu einem als Kontrollkulturen nur in Minimalmedium gehalten wurden, zum anderen mit 50 ng/ml GDNF und 10 ng/ml BDNF in Kombination behandelt wurden. An den Kulturtagen 8 und 10 wurden behandelte und unbehandelte Kulturen geerntet und fixiert. Kryostatschnitte der Kulturen wurden wiederum einer Doppel-Immunfärbung mit dem monoklonalen Antikörper Rho4D2, der gegen Stäbchen gerichtet ist und dem

polyklonalen roten und grünen Zapfenspezifischen Antikörper CERN906 gefärbt. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden zusätzlich die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

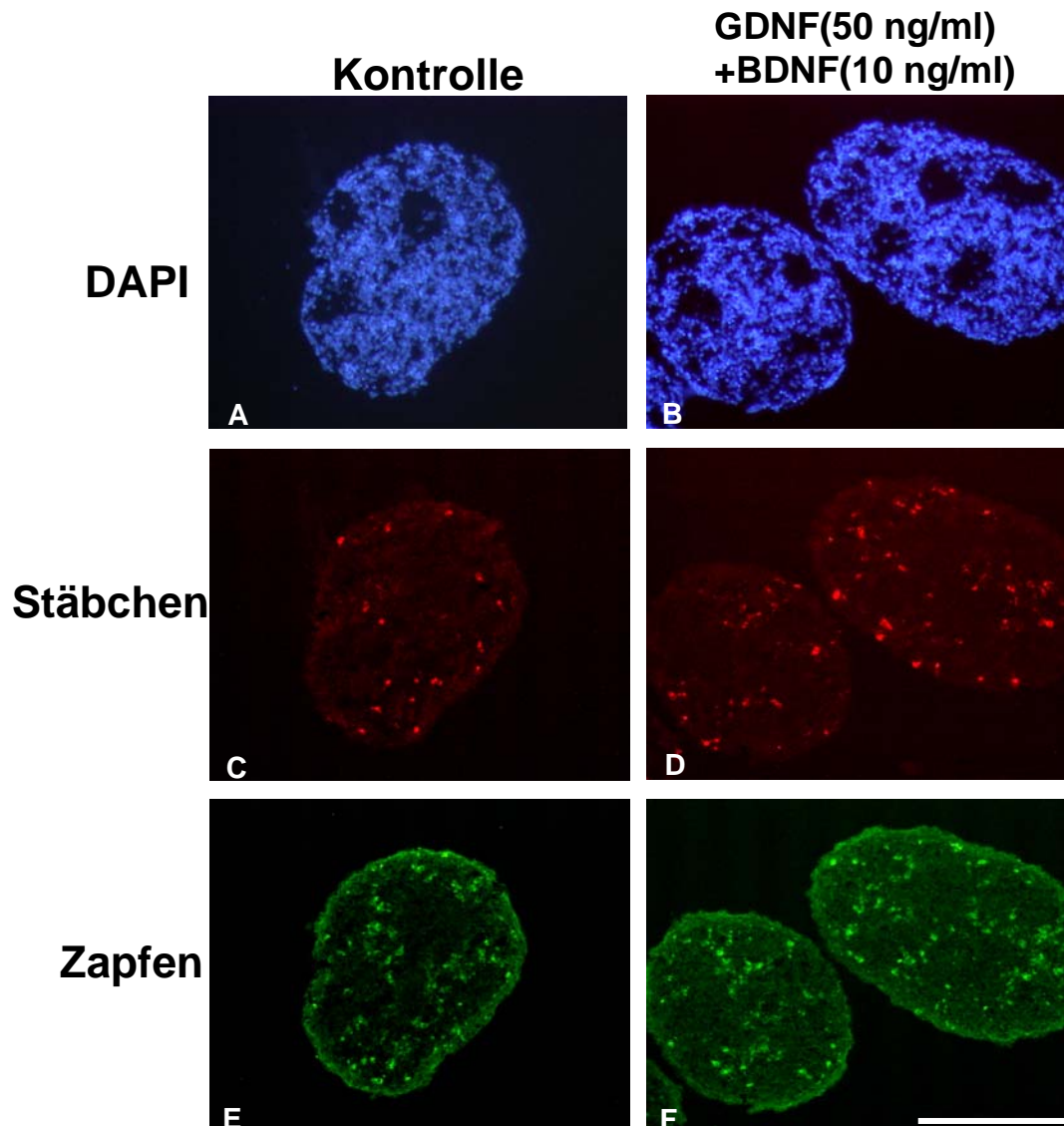


Abbildung 30. Der Effekt der Zugabe von exogenen GDNF und BDNF in Kombination auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 10. Doppel-Immunfärbungen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 und dem Zapfen-spezifischen Antikörper CERN906 in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **A:** Gezeigt ist ein Kontrollsphäroid, der mit DAPI gefärbt wurde. **B:** Immunfärbung gegen Stäbchen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 in einem Kontrollsphäroid. **C:** Rosettensphäroid, der unter Kontrollbedingungen kultiviert und mit CERN906 gefärbt wurde, der spezifisch gegen rote und grüne Zapfen gerichtet ist. **D:** DAPI-Zellkernfärbung eines mit GDNF und BDNF behandelten Rosettensphäroid. **E:** In dem gezeigten Rosettensphäroid, der mit GDNF und BDNF behandelt wurde, konnten zu diesem Zeitpunkt deutlich vermehrt Rho4D2-positive Zellen

nachgewiesen werden. **F:** Die Immunfärbung gegen rote und grüne Zapfen nach der Zugabe von GDNF und BDNF lässt, im Vergleich mit der Kontrolle, eine höhere Anzahl an Cern906-positiven Zellen detektieren. Balken = 200 µm.

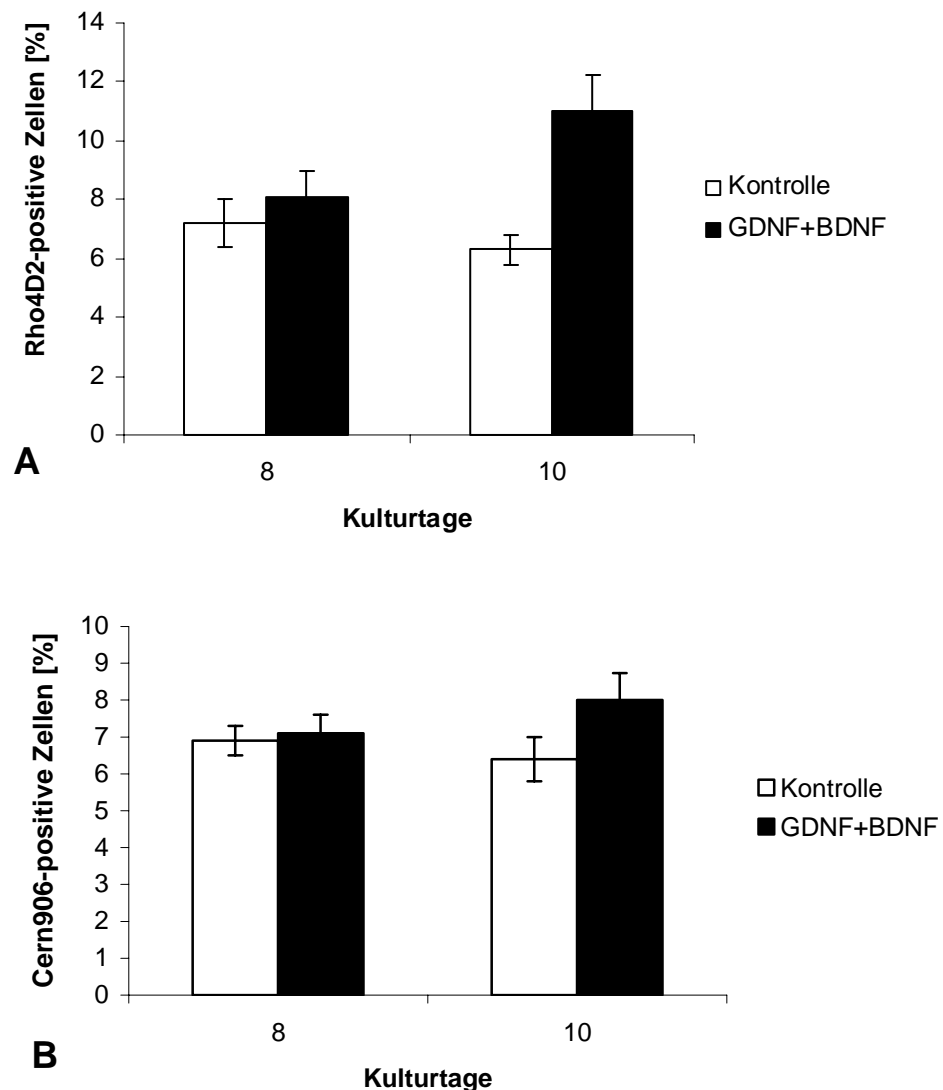


Abbildung 31. Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von GDNF und BDNF in Kombination an den Kulturtagen 8 und 10. A: An den untersuchten Kulturtagen 8 und 10 konnten mehr Rho4D2-positive Zellen nachgewiesen werden, wenn GDNF und BDNF zugegeben wurde. Deutlich ist die Erhöhung der Zellzahlen für Stäbchen an Kulturtag 10. **B:** Die Quantifizierung der Zellzahlen für rote und grüne Zapfen zeigt nach der Zugabe von GDNF und BDNF leicht erhöhte Zellzahlen. Während in Kontrollen die Zellzahlen für CERN906-positive Zellen wieder an Kulturtag 10 abnimmt, können in den behandelten Sphäroiden nach der Zugabe von GDNF und BDNF mehr Zapfen nachgewiesen werden, als an Kulturtag 8.

Die Doppel-Immunfärbung gegen Stäbchen und rote und grüne Zapfen zeigte einen ähnlichen Einfluss von GDNF und BDNF in Kombination, wie für GDNF alleine (siehe Gliederungspunkt 4.1.4.1). Im Vergleich zu den Kontrollen konnten in den

behandelten Kulturen 8% Rho4D2-positive Zellen an Kulturtag 8 nachgewiesen werden, an Kulturtag 10 waren 11% aller Zellen Rho4D2-positiv. Die Kontrollen wiesen 7% Stäbchen an Kulturtag 8 auf und an Kulturtag 10 waren 6,3% Zellen Rho4D2-positiv. Das heißt, während in Kontrollen die Zellzahlen mit zunehmender Entwicklung abnahmen, konnten in den behandelten Sphäroiden eine Zunahme von Rho4D2-positiven Zellen detektiert werden. Dieses Bild zeigte sich ähnlich nach der Behandlung mit GDNF alleine (Gliederungspunkt 4.1.4.1). Doch mit dem Unterschied, dass jetzt durch den zusätzlichen Einfluss von BDNF, die Zellzahlen an Kulturtag 8 für Rho4D2-positive Zellen leicht hoch reguliert wurden.

Während in den GDNF-Kulturen in Gliederungspunkt 4.1.4.1 an Kulturtag 10, gegenüber dem Kulturtag 8, eine Abnahme der CERN906-positiven Zellen zu detektieren war, wurden die Zellzahlen durch die Behandlung von GDNF und BDNF an Kulturtag 10 noch weiter auf 8% erhöht. An Kulturtag 8 waren nur 7% CERN906-positiv. Das bedeutet, im Zusammenwirken mit BDNF fördert GDNF das Überleben von Zapfen. Die Kontrollen wiesen zwischen 6% und 7% CERN906-positive Zellen auf.

4.1.4.10 Die Kombination von GDNF und PEDF führt zu gegensätzlichen Effekten

Nachdem in Gliederungspunkt 4.1.4.9 gezeigt werden konnte, dass die Kombination von Faktoren noch weitere Effekte mit sich führen kann, sollte jetzt untersucht werden, welchen Einfluss die Kombination von GDNF mit PEDF haben sollte. Wiederum wurden die Zellzahlen der Photorezeptoren ermittelt, mittels Doppel-Immunfärbungen gegen Stäbchen und rote und grüne Zapfen mit den Antikörpern Rho4D2 und CERN906. Erneut wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt, um später die Zellzahlen quantifizieren zu können. Rosettensphäroide wurden unter Kontrollbedingungen, d.h. in Minimalmedium und unter der Zugabe von 50 ng/ml GDNF und 50 ng/ml PEDF angezüchtet. Von den Kulturtagen 8 und 10 wurden Proben geerntet und fixiert, sowie aus ihnen Kryostatschnitte hergestellt, die dann der Doppel-Immunfärbung unterzogen wurden.

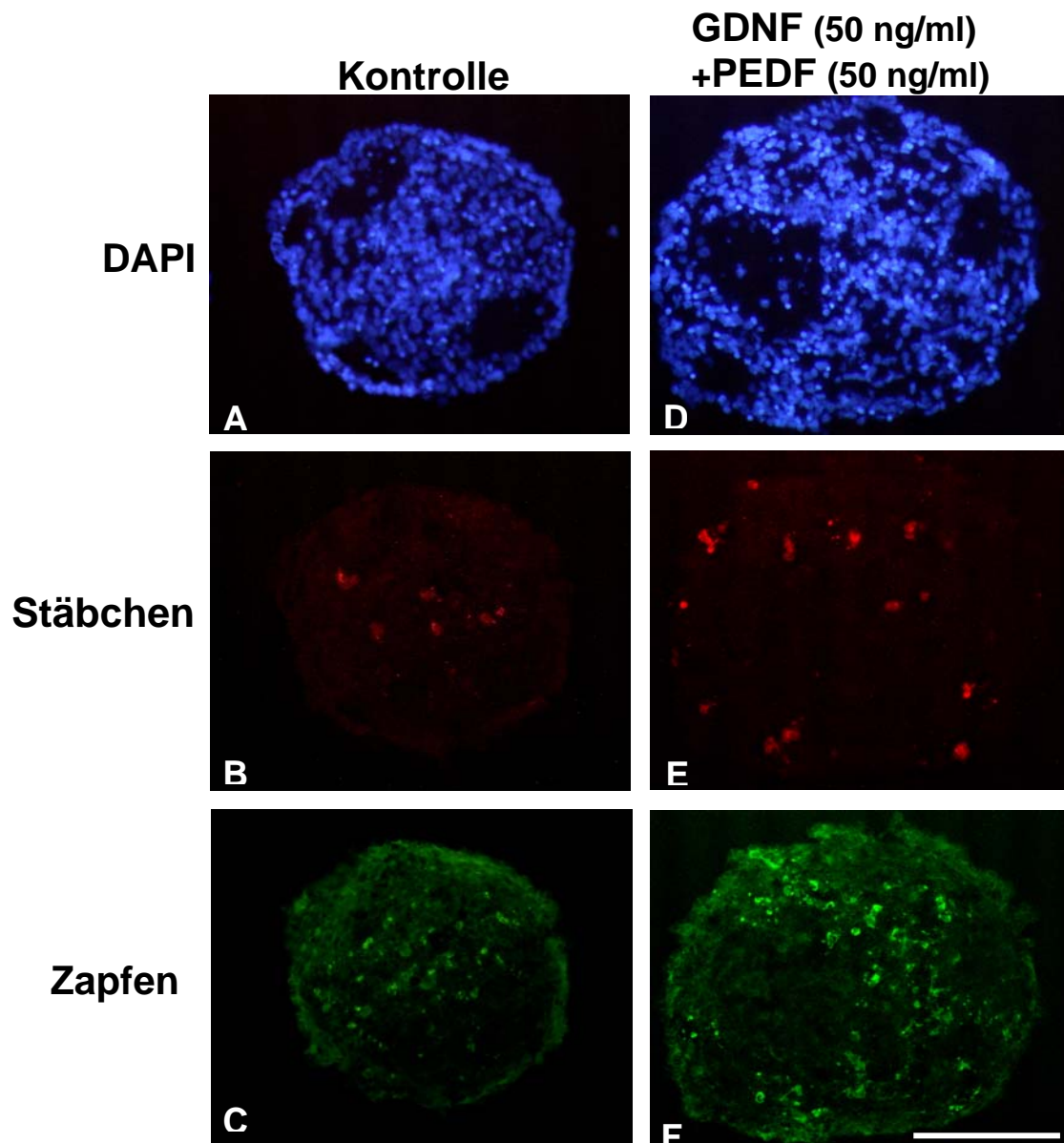


Abbildung 32. Der Effekt der Zugabe von exogenen GDNF und PEDF in Kombination auf die Zellzahlen der Photorezeptoren an Kulturtag 10. Doppel-Immunfärbungen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 und dem Zapfen-spezifischen Antikörper CERN906 in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroiden. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **A:** Gezeigt ist ein Kontrollsphäroid, der mit DAPI gefärbt wurde. **B:** Immunfärbung gegen Stäbchen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 in einem Kontrollsphäroid. **C:** Rosettensphäroid, der unter Kontrollbedingungen kultiviert wurde und mit CERN906 angefärbt wurde, der spezifisch gegen rote und grüne Zapfen gerichtet ist. **D:** DAPI-Zellkernfärbung eines mit GDNF und PEDF behandelten Rosettensphäroids. **E:** In dem gezeigten Rosettensphäroid, der mit GDNF und PEDF behandelt wurde, können zu diesem Zeitpunkt, verglichen mit der Kontrolle, wesentlich mehr Rho4D2-positive Zellen nachgewiesen werden. **F:** Die Immunfärbung gegen rote und grüne Zapfen, lässt im Vergleich mit der Kontrolle, nach der Zugabe von GDNF und BDNF, eine deutlich höhere Anzahl an CERN906-positiven Zellen detektieren. Balken = 100 µm.

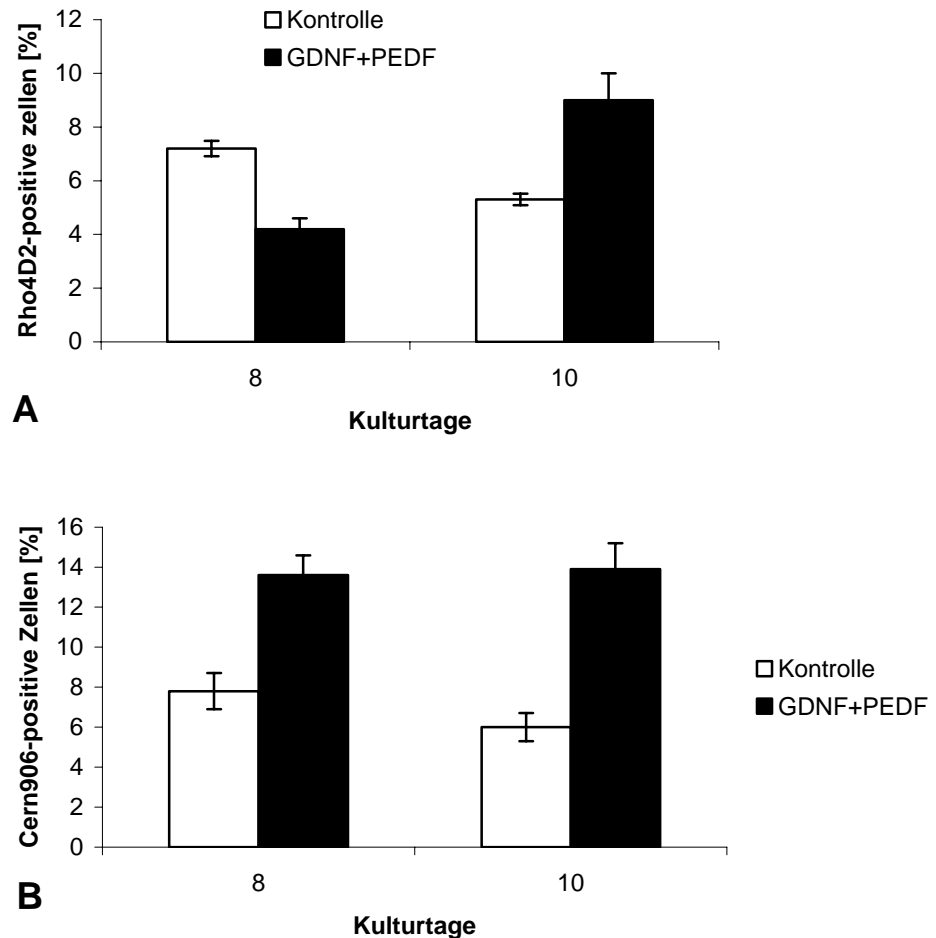


Abbildung 33. Quantifizierung der Zellzahlen für Stäbchen und Zapfen in Kontrollkulturen und nach der Zugabe von GDNF und PEDF in Kombination an den Kulturtagen 8 und 10. A: An dem ersten untersuchten Kulturtag 8 können in der Kontrolle wesentlich mehr Rho4D2-positive Zellen nachgewiesen werden, als in den mit GDNF und PEDF behandelten Kulturen. An Kulturtag 10 zeigt sich die umgekehrte Situation: Die behandelten Sphäroide weisen stark erhöhte Zellzahlen von Stäbchen auf, während in Kontrollen weniger Stäbchen detektiert werden können. **B:** Die Quantifizierung der Zellzahlen für rote und grüne Zapfen zeigt nach der Zugabe von GDNF und BDNF gleich bleibend sehr hohe Zellzahlen für CERN906-positive Zellen, während in Kontrollen an Kulturtag 10 weniger Zapfen nachgewiesen werden können, als an Kulturtag 8.

Die Doppel-Immunfärbungen in den mit GDNF und PEDF in Kombination behandelten Rosettensphäroide zeigten zwei unterschiedliche Effekte: An Kulturtag 8 konnte in den behandelten Kulturen 4% Rho4D2-positive Zellen nachgewiesen werden. Für den Vergleich: in GDNF behandelten Sphäroiden betrugen die Zellzahlen zu diesem Zeitpunkt nahezu 10% und in PEDF-behandelten Sphäroiden lediglich 2,3%. Das heißt, in der Kombination von GDNF und PEDF scheinen sich beide Faktoren zu diesem Zeitpunkt zu kompensieren, was zumindest die Stäbchen betrifft. An Kulturtag 10 erreichten die Zellzahlen der Rho4D2-positiven Zellen einen

Wert von 9%, ein Wert der mit den Zellzahlen der GDNF-Kulturen (vgl. Gliederungspunkt 4.1.4.1) im Einklang steht, während in den PEDF-behandelten Sphäroiden signifikant weniger Stäbchen detektiert werden konnten (vgl. Gliederungspunkt 4.1.4.4). In der Kombination von GDNF und PEDF scheint nun der Überlebensseffekt von GDNF auf die Stäbchen sich durchzusetzen.

Anders sieht die Situation für den Zapfen aus: Die gleich bleibenden Werte an Kulturtag 8 und Kulturtag 10 (ca.13%) deuten auf den Zapfen-überlebenden Effekt von PEDF hin (vgl. Gliederungspunkt 4.1.4.4).

4.1.5 Der Einfluss von GDNF, PEDF und BDNF auf Zellen der INL

Neben Photorezeptoren entwickeln sich im Rosettensphäroidsystem vor allem Zellen der INL. Für verschiedene neurotrophe Faktoren konnten Effekte auf die unterschiedlichen Typen der INL nachgewiesen werden. Insbesondere sind die Amakrinzellen betroffen. So zeigte sich bisher BDNF in Bezug auf Amakrinzellen besonders potent. In diesem Abschnitt der Arbeit sollte nun geklärt werden, ob die mehrfach beschriebenen Effekte der neurotrophen Faktoren GDNF, PEDF und BDNF ebenfalls für das Rosettensphäroidsystem zutreffen.

4.1.5.1 BDNF erhöht die Zellzahlen der Amakrinzellen, PEDF mindert sie

Rosettensphäroide wurden in Minimalmedium für 10 Tage kultiviert, als Kontrollkulturen und unter der Zugabe von 50 ng/ml GDNF, bzw. 50 ng/ml PEDF bzw. 10 ng/ml BDNF. An den jeweiligen Kulturtagen wurden Rosettensphäroide geerntet und für die Herstellung von Kryostatschnitten fixiert. Die Kryostatschnitte wurden einer immunhistochemischen Färbung mit dem Amakrinzellen-spezifischen Antikörper Pax6 unterzogen, welcher aber auch unter anderem diverse Ganglienzell-Populationen anfärben kann. Für eine Quantifizierung der Zellzahlen wurden zudem die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

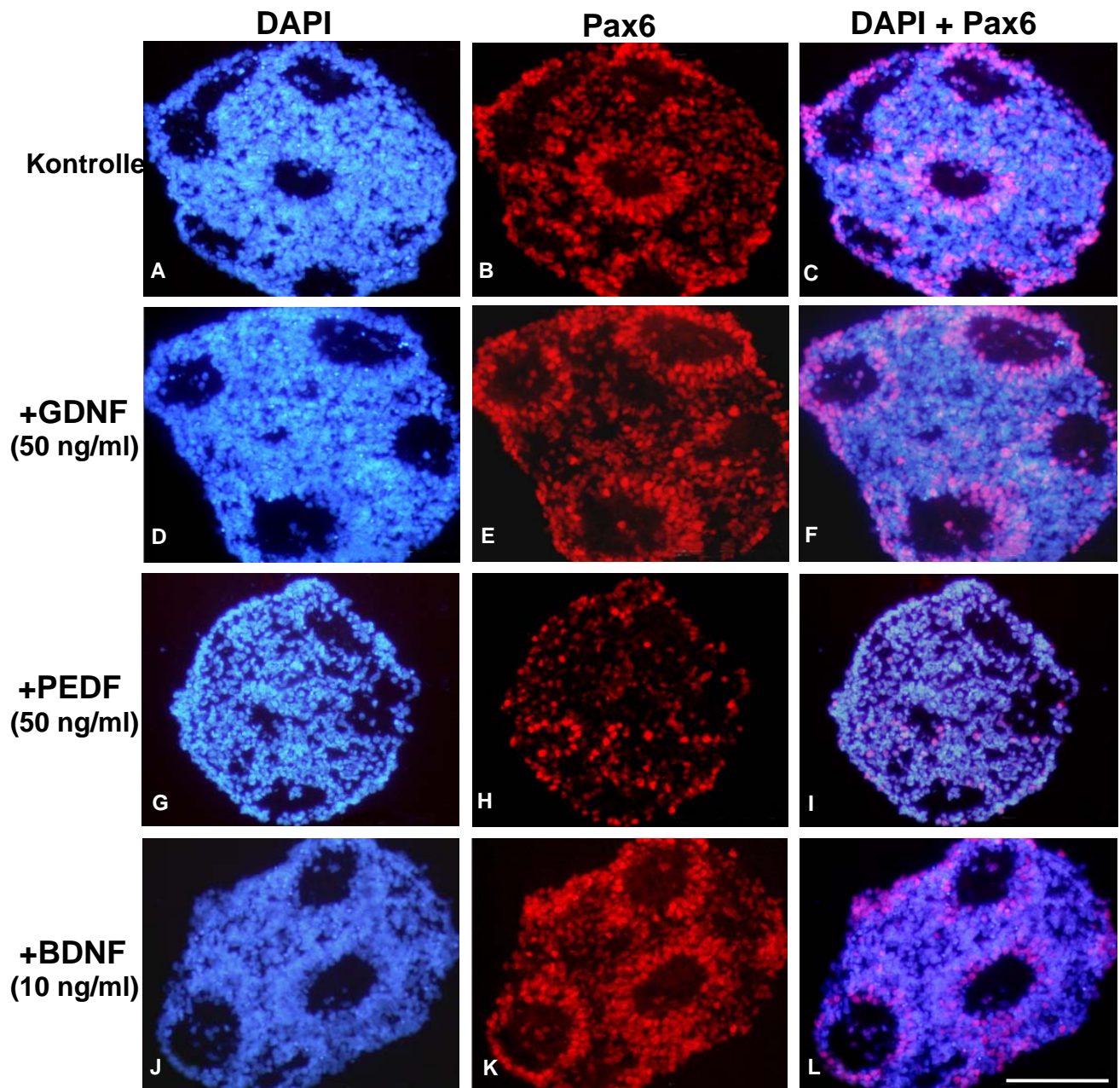


Abbildung 34. Nachweis der Pax6-positiven Zellen in Rosettensphäroiden des Kulturtages 6. **A:** Dapi-Färbung eines Kontrollsphäroids. **B:** Pax6-Färbung eines Sphäroids, der unter Kontrollbedingungen kultiviert wurde. **C:** Übereinanderlagerung von (A) und (B). **D:** DAPI-Färbung eines Sphäroids, der mit 50 ng/ml GDNF behandelt wurde. **E:** Pax6-Färbung eines GDNF-behandelten Sphäroids. **F:** Übereinanderlagerung von (D) und (E). **G:** DAPI-Färbung eines Sphäroids, der mit 50 ng/ml PEDF behandelt wurde. **H:** Pax6-Färbung eines PEDF-behandelten Sphäroids. **I:** Übereinanderlagerung von (G) und (H). **J:** DAPI-Färbung eines Sphäroids, der mit 10 ng/ml BDNF behandelt wurde. **K:** Pax6-Färbung eines BDNF-behandelten Sphäroids. **L:** Übereinanderlagerung von (J) und (K). Deutlich zeigen sich in den mit BDNF behandelten Sphäroiden wesentlich mehr Pax6-positive Zellen. Im Kontrast dazu steht die Immunfärbung der PEDF-behandelten Kulturen: In diesen sind weniger Zellen Pax6-positiv. Zusätzlich zeigt sich eine erhöht gestörte Organisation der Rosettensphäroidstruktur. Balken = 100 μ m.

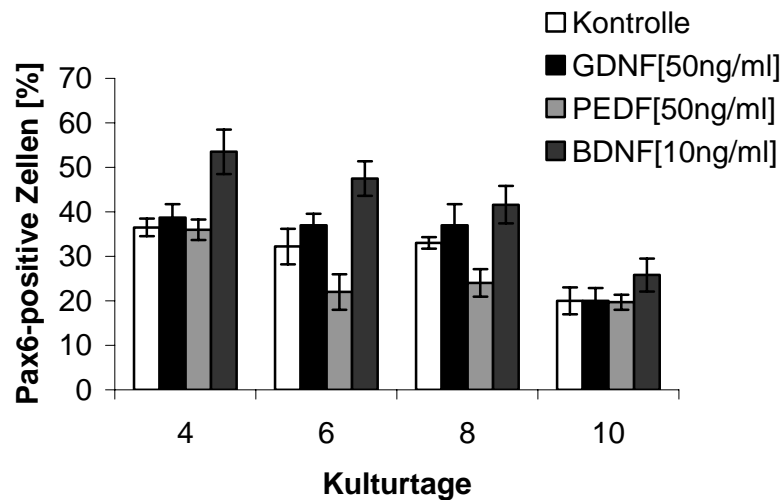


Abbildung 35. Quantifizierung der Pax6-positiven Zellen in unbehandelten und behandelten Rosettensphäroiden der Kulturtag 4, 6, 8 und 10. DAPI-positive Zellen wurden gleich 100% gesetzt und die Pax6-positiven Zellen jeweils in Relation gezogen. Die Analyse verdeutlicht die zwei entgegen gesetzten Effekte von BDNF und PEDF. BDNF führt zu einer signifikanten Zunahme von Pax6-positiven Zellen, während PEDF zu einer leichten Abnahme der Pax6-positiven Zellen führt.

Da im Rosettensphäroidsystem nur wenige Ganglienzellen entwickelt werden, bzw. diese bisher sich nicht eindeutig nachweisen lassen, kann man davon ausgehen, dass der Großteil der Pax6-positiven Zellen Amakrinzellen darstellt. In der Quantifizierung in Abbildung 35 zeigten sich für die einzelnen neurotrophen Faktoren unterschiedliche Effekte: Die Zugabe von GDNF zeigte, im Vergleich zu den Kontrollen, keine signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen der Amakrinzellen. Die GDNF-behandelten Kulturen wiesen während der gesamten Kultivierung lediglich 4% mehr Amakrinzellen als die Kontrollen auf. Es konnte, sowohl in den Kontrollen, als auch in den GDNF-Kulturen, eine stetige Abnahme der Amakrinzellen (35-40%), beginnend von Kulturtag 4 bis zu Kulturtag 6 und 8 (ca. 30-35%), nachgewiesen werden. Erst an K10 zeigte sich eine deutliche Minderung; die Zellzahlen der Amakrinzellen betrugen 20%.

Auffallend zeigte sich der Effekt nach der Behandlung mit BDNF: Der signifikanteste Unterschied zwischen den unterschiedlichen Behandlungen drückte sich vor allem in den wesentlich höheren Zellzahlen aus. Zudem zeigte sich eine stetig graduelle Abnahme der Amakrinzellen. Am Kulturtag 4 konnten 53% aller Zellen als Amakrinzellen detektiert werden, an Kulturtag 10 waren es noch 25%.

Im Kontrast zu der Behandlung von BDNF enthüllte die Zugabe von exogenen PEDF geringere Zellzahlen für Pax6-positive Zellen, vor allem an den Kulturtagen 6 und 8 mit ca. 22%. Erst an Kulturtag 10 werden die Zahlen der Kontrollen und GDNF-behandelten Sphäroide erreicht. Lediglich die Behandlung mit BDNF führte zu diesem Zeitpunkt noch zu erhöhten Zellzahlen der Amakrinzellen.

4.1.5.2 BDNF erhöht die AChE-Aktivität

Eine weitere Charakterisierung der Zellen der INL, vor allem der Amakrinzellen, kann über den Nachweis der AChE-Aktivität erfolgen. Dabei können Neurone nachgewiesen werden, die Acetylcholin als Neurotransmitter verwenden. In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, ob GDNF oder BDNF Effekte auf cholinerge Neuronen im Rosettensphäroidsystem ausüben. Dazu wurden Rosettensphäroide unter Kontrollbedingungen, unter der Zugabe von 50 ng/ml GDNF bzw. unter Zugabe von 10 ng/ml BDNF für 10 Tage kultiviert. Zu den jeweiligen Kulturzeitpunkten wurden Kulturen geerntet, fixiert und daraus Gefrierschnitte hergestellt. Die Schnitte der Sphäroide wurden einer Karnovsky-Roots-Färbung unterzogen, um die AChE-Aktivität nachzuweisen. Eine erhöhte Aktivität der AChE wird als braune Färbung, aufgrund der Umsetzung eines Farbstoffes, sichtbar.

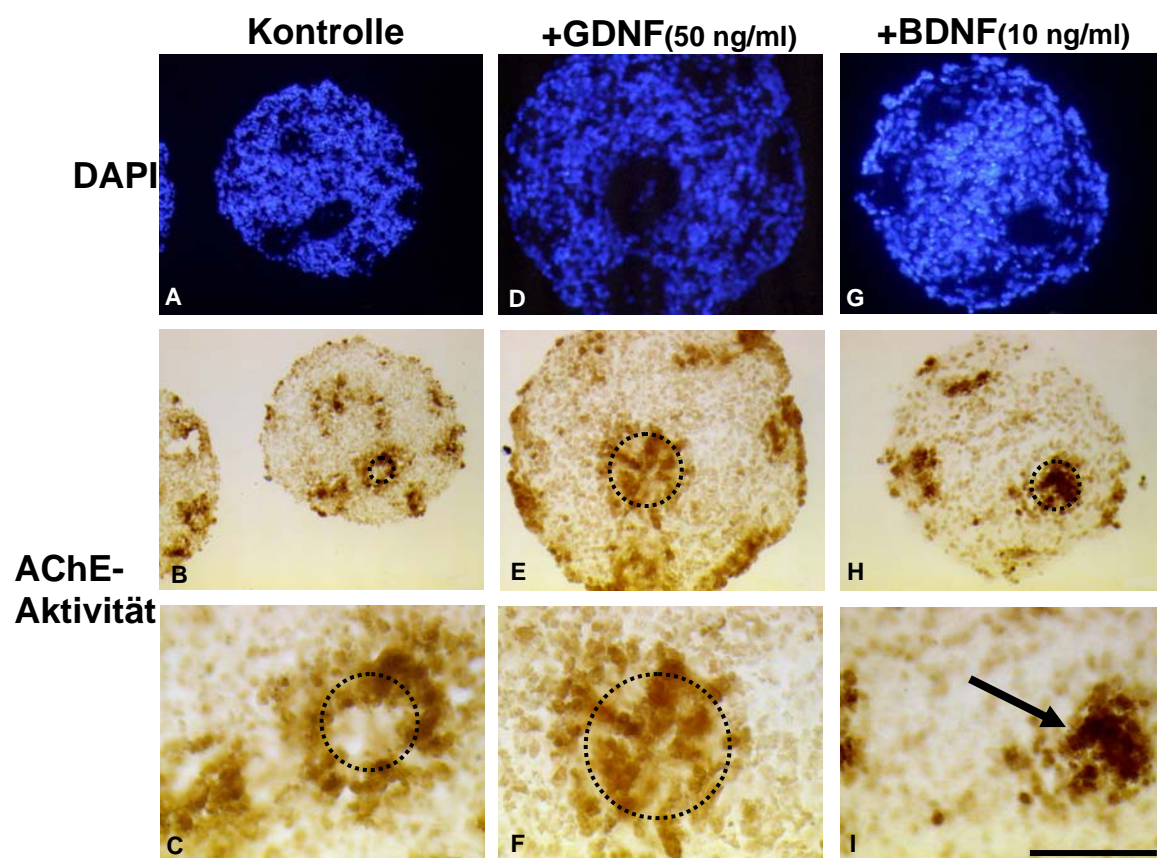


Abbildung 36. Nachweis der AChE-Aktivität in Rosettensphäroiden des Kulturtages 10. **A:** Dapi-Färbung eines Sphäroids, der unter Kontrollbedingungen kultiviert wurde. **B:** Karnovsky-Roots-Färbung eines Kontrollsphäroids. **C:** Vergrößerung von (B). **D:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids, der mit 50 ng/ml GDNF behandelt wurde. **E:** Karnovsky-Roots-Färbung eines Sphäroids, der mit GDNF behandelt wurde. **F:** Vergrößerung von (E). **G:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroids, der mit 10 ng/ml BDNF behandelt wurde. **H:** Karnovsky-Roots-Färbung eines Rosettensphäroids, der mit BDNF behandelt wurde. **I:** Vergrößerung von (H). Besonders intensive Braunfärbungen, also AChE-Aktivitäten, befinden sich in den IPL-Bereichen (gestrichelte Kreise). Im Vergleich zu den Kontrollkulturen und den mit GDNF behandelten Kulturen zeigen BDNF behandelte Kulturen eine wesentlich intensivere Braunfärbung auf (Pfeil in I). Balken = 200 µm in A,B; 100 µm in D,E,G,H; 50 µm in C,F,I.

Der Nachweis der AChE-Aktivität mittels einer Karnovsky-Roots-Färbung zeigte deutliche Farbunterschiede nach den unterschiedlichen Behandlungen. Für alle Kulturbedingungen gleich, konnte die intensivste Braunfärbung vor allem in IPL-Bereichen identifiziert werden. Der Ort, wo sich die Synapsen der Zellen der INL und der *displaced* Ganglienzellen befinden. Jedoch zeigten unterschiedliche Behandlungen auch unterschiedliche AChE-Aktivitäten: Die Karnovsky-Roots-Färbungen in Abbildungen 36B und E zeigen, dass Kontrollkulturen, im Vergleich mit GDNF-behandelten Kulturen, eine leicht intensivere Braunfärbung, und damit auch eine höhere AChE-Aktivität, aufwiesen. Einen deutlicheren Effekt auf die AChE-Aktivität zeigte jedoch die Zugabe von exogenen BDNF in Abbildung 36H und I: Im Vergleich mit den Kontrollen und den GDNF-behandelten Sphäroiden zeigte sich in den IPL-Bereichen eine starke Braunfärbung, wesentlich intensiver als in den Kontrollkulturen. Diese Färbungen sprechen für eine erhöhte AChE-Aktivität, ausgelöst durch die exogenen Zugabe von BDNF.

4.1.5.3 GDNF erhöht die Expression von Tyrosinhydroxylase mRNA

Mehrfach konnte gezeigt werden, dass GDNF das Überleben dopaminerger Neurone im ZNS fördern kann. In der Retina gibt es ebenfalls Neurone, die Dopamin als Neurotransmitter verwenden. Diese Zellen befinden sich in der INL und sind ausnahmslos Amakrinzellen. Diese dopaminergen Amakrinzellen können über die Tyrosinhydroxylase (TH), das Geschwindigkeits-Bestimmende Enzym der Dopaminsynthese, nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang sollte die endogene Tyrosinhydroxylase (TH)-Expression in Rosettensphäroiden nachgewiesen werden und geklärt werden, ob die Zugabe von exogenen GDNF, Effekte auf die Expression

von Tyrosinhydroxylase (TH) hat. Der Nachweis sollte auf der Genexpressions- sowie Proteinebene erfolgen.

Es wurden Rosettensphäroide unter Minimalbedingungen und unter der Zugabe von 50 ng/ml GDNF für 10 Tage kultiviert. Zu den jeweiligen Kulturzeitpunkten wurden Proben gesammelt und daraus die mRNA isoliert. Über eine semiquantitative RT-PCR wurden schließlich PCR-Produkte für die Tyrosinhydroxylase (TH) ermittelt.

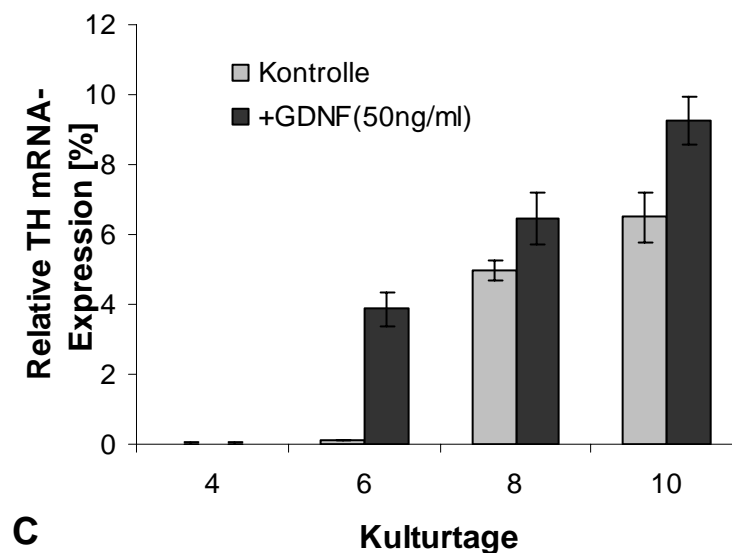
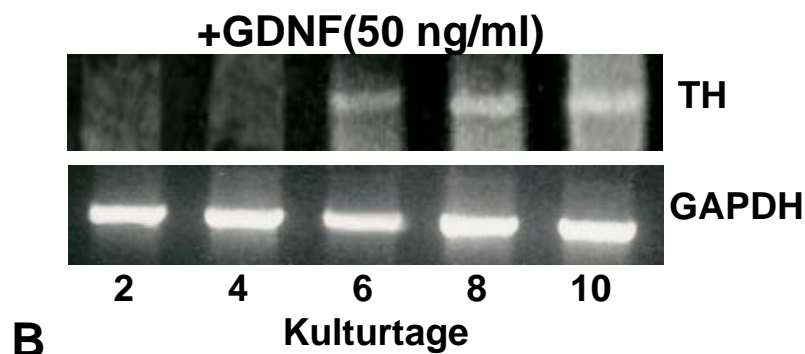
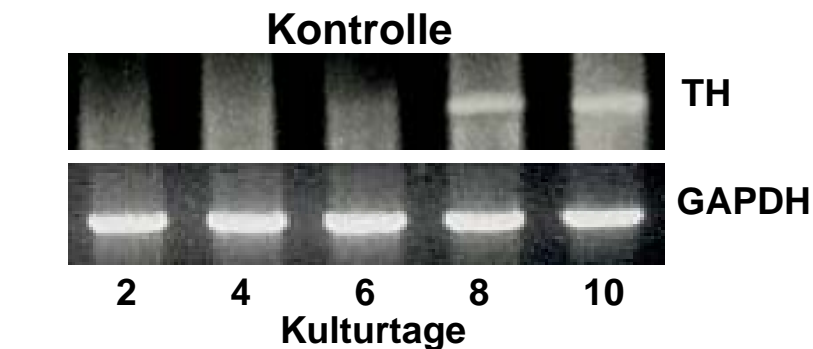


Abbildung 37. Temporale Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10. **A:** Gezeigt sind die aufgetrennten PCR-Produkte für Tyrosinhydroxylase (TH) und GAPDH in Rosettensphäroiden, die unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden. **B:** Gezeigt sind die PCR-Produkte für Tyrosinhydroxylase (TH) und GAPDH nach der Zugabe von 50 ng/ml GDNF. **C:** Densitometrische Auswertung von (A) und (B). Der Wert für die GAPDH-Expression wurde zu den jeweiligen Kulturtagen gleich 100% gesetzt und die relative Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA daraus ermittelt. Die densitometrische Quantifizierung zeigt nach der Zugabe von GDNF eine frühere und verstärkte Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression, verglichen mit den Kontrollen.

In Rosettensphäroiden, die nur unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden, konnte erste Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression am Kulturtag 6 mit lediglich 0,1% relative mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 37B, C). In den GDNF-behandelten Kulturen zeigte sich bereits zu diesem Zeitpunkt eine Expression von 3,9%. Die durch GDNF-Zugabe verstärkte Intensität in der Tyrosinhydroxylase (TH)-Expression setzte sich an den folgenden Kulturtagen fort. An Kulturtag 8 zeigten GDNF behandelte Kulturen eine Expression von 6,3% relative Expression und an Kulturtag 10 betrug die Expression 9%. Die densitometrische Auswertung in Abbildung 31C wies für Kontrollkulturen geringere Expressionsstärken auf. An Kulturtag 8 betrug die relative Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression 5% und an Kulturtag 10 betrug die Expression 6,2%. Quantitativ stieg die Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression graduell an, in Kontrollen sowie unter GDNF-Behandlung. Jedoch konnte die Zugabe von GDNF die Intensität der Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression wesentlich verstärken.

4.1.5.4 GDNF erhöht die Proteinexpression der Tyrosinhydroxylase (TH)

Der in Gliederungspunkt 4.1.5.3 beschriebene Effekt von GDNF auf die dopaminergen Amakrinzellen konnte mittels eines Immunoblots gefestigt werden. Dafür wurden Rosettensphäroide unter Minimalbedingungen und unter der Zugabe von 50 ng/ml GDNF über einen Zeitraum von 10 Tagen kultiviert. Zu den Entwicklungszeitpunkten 6, 8 und 10 wurden jeweils Proben entnommen und für eine SDS-Page Gelelektrophorese aufgearbeitet. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die Proteinexpression mittels eines spezifisch gegen Tyrosinhydroxylase (TH) gerichteten Antikörper nachgewiesen.

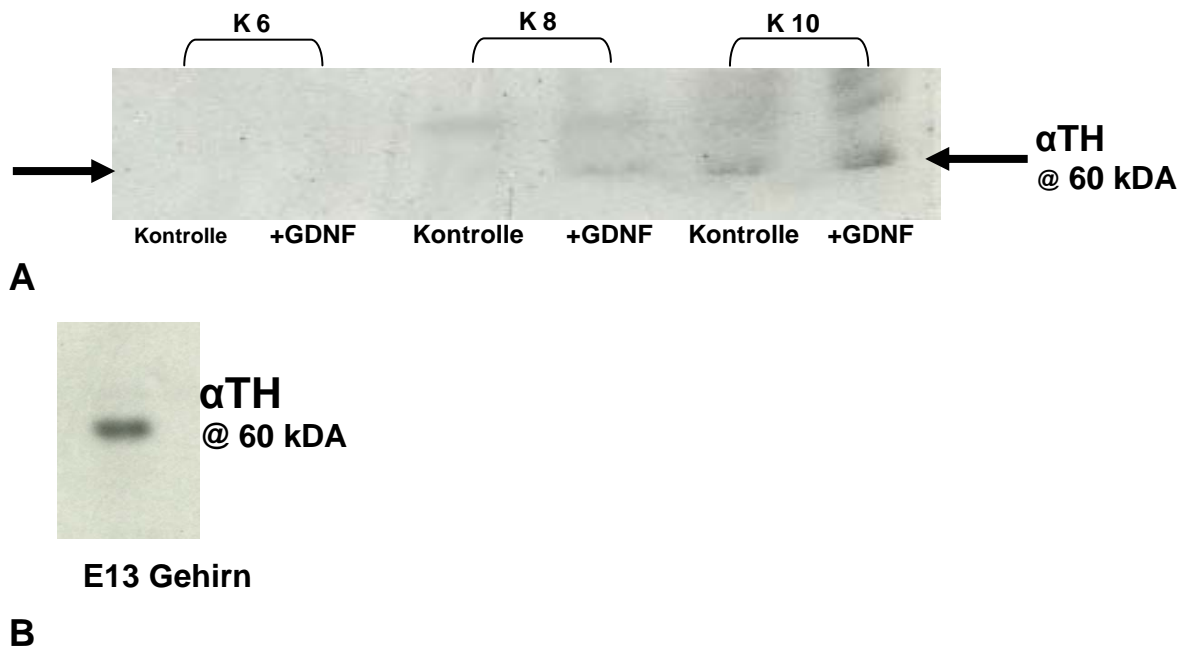


Abbildung 38. Proteinexpression von Tyrosinhydroxylase (TH) in Rosettensphäroiden, kultiviert unter Serum-reduzierten Bedingungen und nach der Zugabe von exogenen GDNF an den Kulturtagen 6, 8 und 10. Der Nachweis erfolgte über einen Western Blot. Die Detektion erfolgte über einen Immunoblot mit dem monoklonalen Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (TH). **A:** GDNF-behandelte Kulturen zeigen an Kulturtag 8 eine deutliche Tyrosinhydroxylase (TH)-Expression, während in den unbehandelten Kontrollsphäroiden erst an Kulturtag 10 erste Signale nachzuweisen sind. Zudem zeigen mit GDNF behandelte Kulturen stärkere Signale als Kontrollkulturen. **B:** Positiv-Kontrolle für den Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (TH) in Gewebe eines Hühnergehirnes des Embryonaltages 13.

Der Immunoblot der Rosettensphäroide der Kulturtage 6, 8 und 10 zeigte ganz deutliche Effekte für die Proteinexpression der Tyrosinhydroxylase (TH), ausgeübt durch die Zugabe von exogenen GDNF: Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollkulturen zeigten Kulturen, die mit GDNF behandelt wurden, bereits am Kulturtag 8 erste Tyrosinhydroxylase (TH)-Expression. In den Kontrollen konnte erste Tyrosinhydroxylase (TH)-Expression lediglich an Tag 10 nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten sich deutliche Unterschiede in den Intensitäten der Expressionssignale. Die GDNF-behandelten Kulturen wiesen wesentlich stärkere Signale auf, verglichen mit den Kontrollkulturen.

4.2 Die Unterdrückung von GDNF zeigt signifikante Konsequenzen für die entwickelnde Retina *in vitro* (*loss-of-function*-Experimente)

Um die funktionale Rolle eines Gens innerhalb der Entwicklung eines Gewebes ausreichend zu untersuchen, kann man neben so genannten *gain-of-function*-Experimenten auch *loss-of-function*-Experimente durchführen. Die Unterdrückung eines Gens kann mitunter dramatische Effekte auf verschiedene Entwicklungsprozesse zur Folge haben, welches einen noch tieferen Einblick in die Funktionalität des zu untersuchenden Gens aufzeigt, als das es mit *gain-of-function*-Experimenten alleine möglich wäre.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte vor allem der Einfluss von GDNF auf die Entwicklung der retinalen Zellen in dem dreidimensionalen Rosettensphäroidsystem untersucht werden. Wie in Gliederungspunkt 4.1 gezeigt, hat die Zugabe von exogenen GDNF entscheidende Einflüsse auf die Retinogenese, speziell auf die Entwicklung von Stäbchen und dopaminergen Amakrinzellen. Ausgehend von diesen Erkenntnissen, sollte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, welche Auswirkungen die Unterdrückung von endogenen GDNF insbesondere für diese Zelltypen der Retina hat.

4.2.1 Unterdrückung der endogenen GDNF-Expression durch den Einsatz eines GDNF*antisense* Expressionsvektors

Um die Transkription von GDNF zu unterdrücken, wurde mit einer GDNF-Sequenz gearbeitet, die der *in vivo*-Originalsequenz in gegensätzlicher Orientierung (*antisense*) vorliegt. Diese GDNF*antisense*-Sequenz wurde in den pCMS-EGFP-Expressionsvektor ligiert, der neben einer prokaryotischen Transkriptionsstelle (Col E1), einem Ampicillin-Resistenzgen (AMP^r) und einer viralen Promotorregion (P_{cmv}) ein zusätzliches eukaryotisches Reportergen besitzt, welches für das grün fluoreszierende Protein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) codiert. Mittels dieses fluoreszierenden Proteins kann über Fluoreszenzmikroskopie eine erfolgreiche Transfektion nachgewiesen werden.

Für die *Antisense*-Methode wurden Rosettensphäroide in Minimalmedium kultiviert und zu den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 wie in Gliederungspunkt 2.2.7 nach

der Kalziumpräzipitationsmethode für mindestens 12 Stunden mit der GDNF*antisense*-Sequenz transfiziert. Als Kontrollen wurden zu einem Rosettensphäroide mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor transfiziert, zum anderen wurden auch nicht-transfizierte Rosettensphäroide mitgeführt. Nach weiteren 48 Stunden post-Transfektionszeit wurden die transfizierten Rosettensphäroide und Kontrollen geerntet und für RNA-Isolierung bzw. Herstellung von Kryostatschnitten bereitgehalten. Vor dem Ernten wurden die Kulturen aufgrund des grün fluoreszierenden EGFP-Proteins unter dem Fluoreszenzmikroskop auf die Effizienz der Transfektion hin kontrolliert, welche sich durch grün fluoreszierende Zellen zeigt, als Marker für eine erfolgreiche Transfektion.

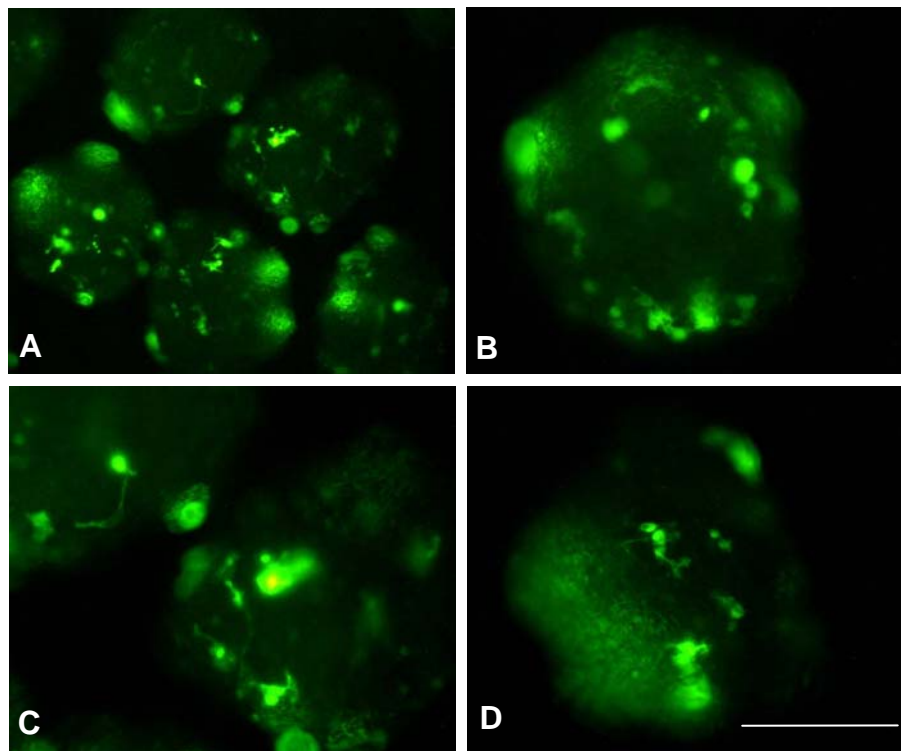


Abbildung 39. Rosettensphäroide des Kulturtages 11 (48 h post Transfektion) transfiziert mit pCMS-EGFP-Expressionsvektor. Die grüne Fluoreszenz repräsentiert die zelleigene Expression des *green fluorescent proteins* und damit den Erfolg der Transfektion. **A+B:** Rosettensphäroide, die mit der GDNF*antisense*-Sequenz transfiziert wurden. **C+D:** Gezeigt sind Kontrollsphäroide, die mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor transfiziert wurden. Balken = 200 µm in A, 100 µm in B,C,D.

Wie in Abbildung 39 gezeigt, konnten die Rosettensphäroide erfolgreich transfiziert werden. Sowohl die mit der *GNDFantisense*-Sequenz transfizierten, als auch die Kontrollsphäroide, zeigten zu allen Kultivierungszeitpunkten, vermehrt grün fluoreszierende Zellen, als einen Beweis für die Funktionalität der Kalziumpräzipitat-Transfektionsmethode im Rosettensphäroidsystem.

4.2.2 Transfektion mit der *GNDFantisense*-Sequenz beeinträchtigt das Wachstum von Rosettensphäroiden

Die Methode der Transfektion an sich beeinflusst die Morphologie und das Größenwachstum der Rosettensphäroide. Darüber hinaus zeigten sich weitere Beeinflussungen im Wachstum nach der Transfektion mit der *GNDFantisense*-Sequenz, verglichen mit Kontrollsphäroide, die lediglich mit dem unveränderten Vektor transfiziert wurden. Es wurden des jeweiligen Kulturtages und der jeweiligen Behandlung jeweils 9 Sphäroide in der zweidimensionalen Fläche (mm^2) vermessen und miteinander verglichen.

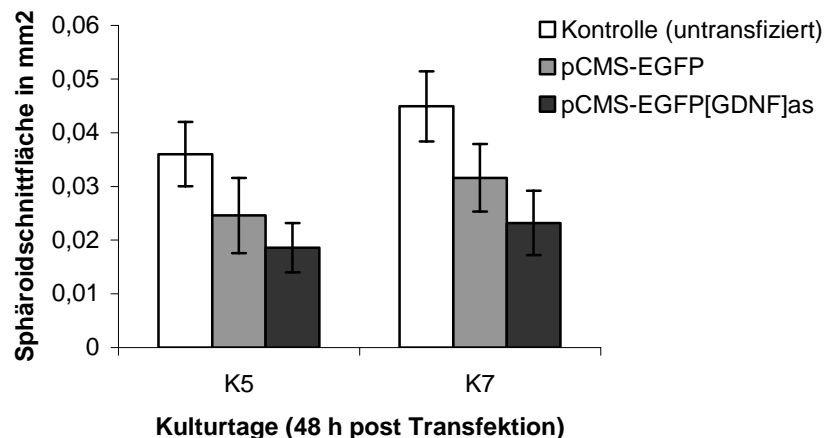


Abbildung 40. Größenverhältnisse der transfizierten und untransfizierten Rosettensphäroide in mm^2 an den Kulturtagen 5 und 7 (48 h post Transfektion). Das Balkendiagramm zeigt zu einem eine Größenreduzierung aufgrund der Transfektion an sich, zum anderen aber auch eine verminderte Größenzunahme zusätzlich nach Transfektion mit der *GNDFantisense*-Sequenz.

Wie das Diagramm in Abbildung 40 zeigt, hat die Methode der Transfektion einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum der Rosettensphäroide. Die Größenzunahme während der Kultivierung blieb bei Kontrollen, die nicht transfiziert wurden, Kontrollen, die mit dem unveränderten Vektor transfiziert wurden und bei

Kulturen, die mit der GDNF*antisense*-Sequenz transfiziert wurden, im selben Verhältnis. Die Größe der Sphäroide nahm mit zunehmender Entwicklungsdauer zu. Transfizierte Kontrollsphäroide entsprachen nur 70-75% der mitgeführten untransfizierten Sphäroiden und mit der GDNF*antisense*-Sequenz transfizierte Sphäroide entsprachen lediglich 50-60% der untransfizierten Sphäroiden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Methode der Transfektion die Zellproliferation signifikant inhibiert, welche durch die Unterdrückung von GDNF noch zusätzlich inhibiert wird.

4.2.3 Endogene GDNF mRNA-Expression wird nach Transfektion mit dem GDNF*antisense*-Expressionsvektor nahezu vollständig unterdrückt

Für einen weiteren Beweis für die Effektivität der Transfektion, und damit auch der erfolgreichen Unterdrückung von GDNF, sollte nun die temporale endogene GDNF mRNA-Expression untersucht werden. Dafür wurden Rosettensphäroide mit dem unveränderten Vektor bzw. mit dem GDNF*antisense*-Expressionsvektor zu den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 12 für 12 Stunden transfiziert und jeweils nach weiteren 48 Stunden post Transfektionszeit geerntet. Aus dem gesammelten Gewebe wurde, wie in Gliederungspunkt 3.2.13 beschrieben, die RNA isoliert, welche dann in cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNA diente als *template* für eine semi-quantitative RT-PCR, in der die endogene GDNF mRNA nachgewiesen wurde.

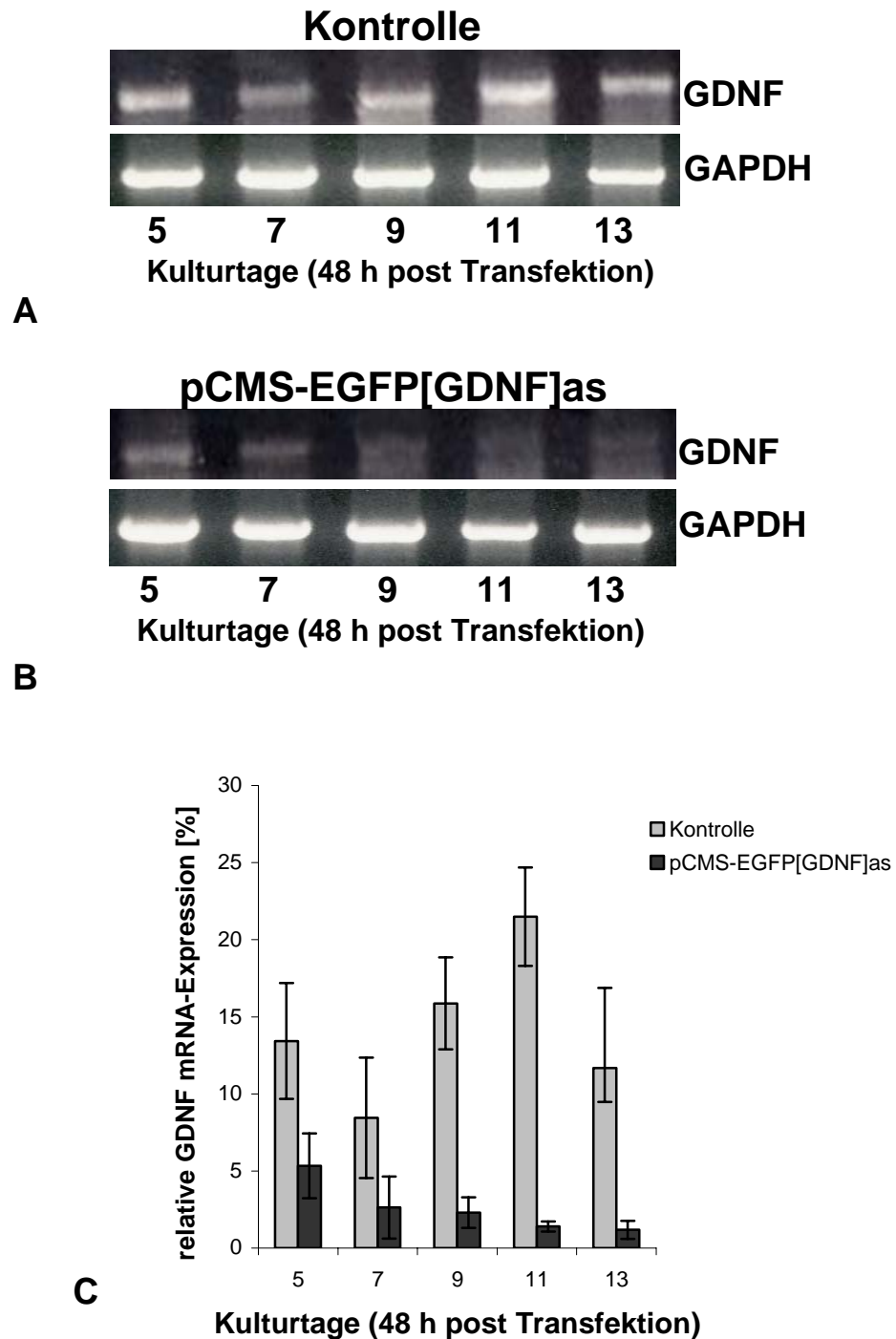


Abbildung 41. Temporale Expression von endogenen GDNF und GAPDH in transfizierten Rosettensphäroiden an den Kulturtagen 5. 7. 9. 11 und 13 (48 h post Transfektion). **A:** Amplifikate von GDNF und GAPDH zu unterschiedlichen Kulturtagen, nach Transfektion mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor. **B:** Amplifikate von GDNF und GAPDH zu unterschiedlichen Kulturtagen, nachdem Rosettensphäroide mit der GDNFantisense-Sequenz transfiziert wurden. **C:** Densitometrische Auswertung von (A) und (B). Die GAPDH-Expression wurde zum jeweiligen Kulturtag gleich 100% gesetzt. Im Vergleich zu den Kontrollen (A) zeigt die Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte eine nahezu vollständige Unterdrückung der GDNF mRNA nach

Transfektion mit der GDNF*antisense*-Sequenz (B). Die densitometrische Auswertung (C) dokumentiert die erfolgreiche Unterdrückung von GDNF.

Das Agarosegel mit den PCR-Produkten für GDNF mRNA zeigte deutlich die Konsequenz der Unterdrückung nach Transfektion mit der GDNF*antisense*-Sequenz. Während in den Kontrollsphäroiden deutliche Signale der GDNF-Amplifikate nachzuweisen waren (Abbildung 41A), ließen sich nur wenige Amplifikate für GDNF, nach der Unterdrückung von GDNF (lediglich an den ersten beiden untersuchten Kulturtagen), nachweisen (Abbildung 41B). Für eine densitometrische Quantifikation wurde die GAPDH-Expression zu jedem Kulturzeitpunkt gleich 100% gesetzt und die GDNF-Expression in Relation gezogen (Abbildung 41C). Die Kontrollsphäroide zeigten eine klare, wenn auch variierende GDNF-Expression, über die gesamte Kultivierungsdauer, mit den stärksten Signalen an Kulturtag 9 (16%) und Kulturtag 11 (22,5%) (48 h post Transfektion). Nach Transfektion mit dem GDNF*antisense*-Expressionsvektor zeigte sich eine stark abgeschwächte Intensität der Signale, eben nur zu den ersten beiden Kulturtagen. Hier konnte die stärkste Expression an Kulturtag 5 (48 h post Transfektion) mit ca. 5% nachgewiesen werden. Am Kulturtag 13 (48 h post Transfektion), der letzte untersuchte Kulturtag, konnte lediglich nur 1% GDNF-Expression nachgewiesen werden, während in den Kontrollen die Expressionsstärke zu diesem Zeitpunkt 12% relative GDNF mRNA-Expression betrug. Diese Ergebnisse zeigen deutlich die erfolgreiche und effektive Unterdrückung von GDNF.

4.2.4 Die Unterdrückung von GDNF mindert signifikant die endogene Expression von Stäbchenrhodopsin

Die Folge der Unterdrückung von GDNF für endogenes Stäbchenrhodopsin sollte zunächst mittels einer semi-quantitativen RT-PCR analysiert werden. Rosettensphäroide wurden an Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor, bzw. mit dem GDNF*antisense*-Expressionsvektor transfiziert. Nach 12 Stunden wurde die Transfektion abgestoppt und nach weiteren 48 Stunden post Transfektionszeit das Sphäroidmaterial geerntet und für eine RNA-Isolierung bereitgestellt. Die isolierte RNA diente als Matrize für die Transkription in cDNA, welche wiederum als Ausgangsmaterial für die anschließende Amplifikation diente.

Die Amplifikate für das Stäbchenrhodopsin und GAPDH wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

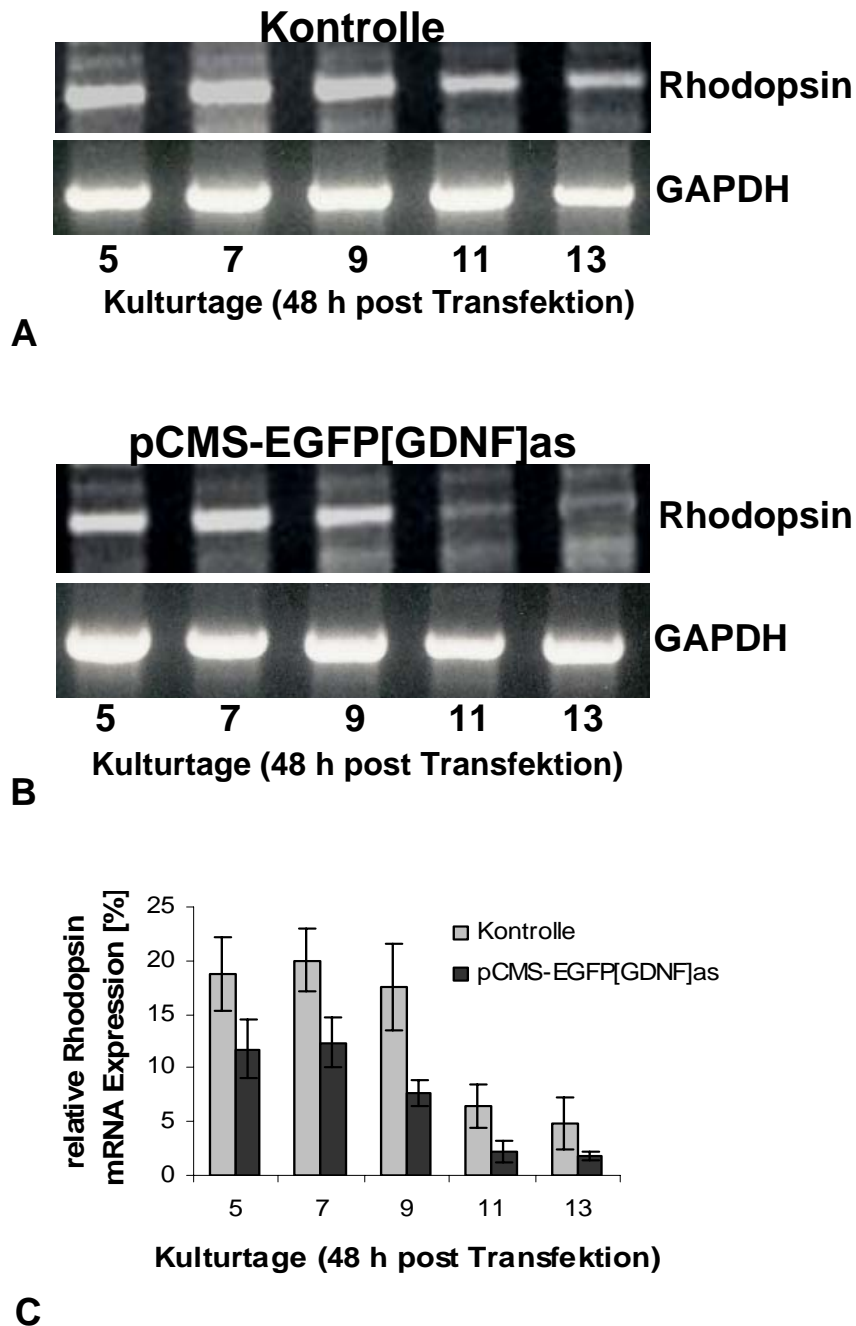
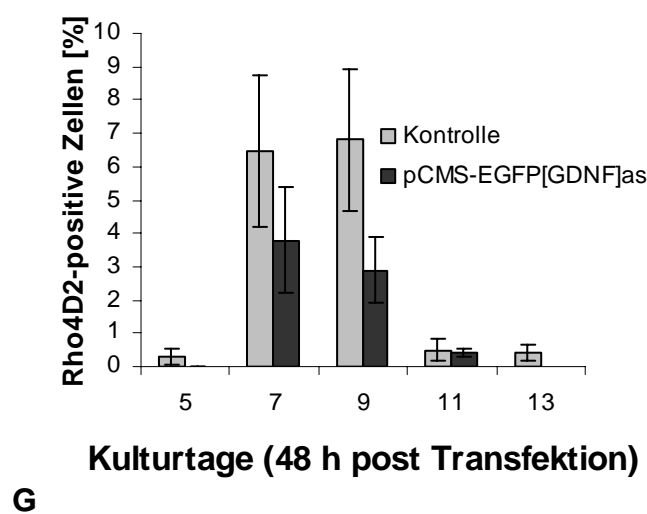
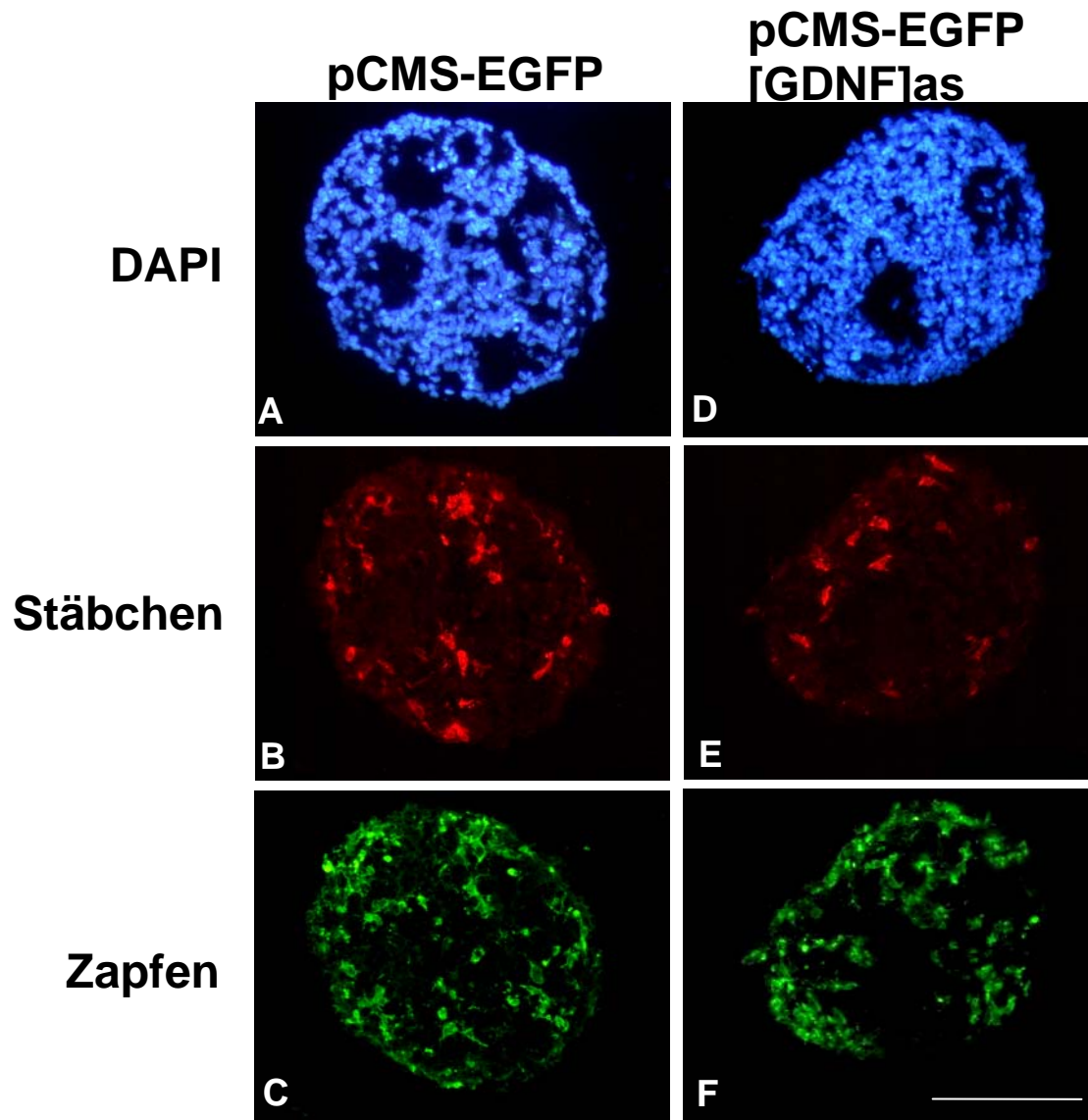


Abbildung 42. Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 5, 7, 9, 11 und 13 (48 h post Transfektion). **A:** Gezeigt sind die aufgetrennten PCR-Produkte für Stäbchenrhodopsin und GAPDH in Kontrollsphäroiden, nach Transfektion mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor. **B:** Gezeigt sind die PCR-Produkte für Stäbchenrhodopsin und GAPDH nach der Transfektion mit der GDNF*antisense*-Sequenz. **C:** Densitometrische Auswertung von (A) und (B). Der Wert für die GAPDH-Expression wurde zu jeweiligen Kulturtag gleich 100% gesetzt und die relative Expression von Stäbchenrhodopsin mRNA daraus ermittelt.

Die Kontrollkulturen in Abbildung 42 zeigten eine starke Stäbchenrhodopsin mRNA-Expression an Kulturtagen 5 bis 9 (48 h post Transfektion), mit 17-20% relative Stäbchenrhodopsin mRNA-Expression, welche dann ab Kulturtag 11 (48 h post Transfektion) signifikant absank (6%) (Abbildung 42A, C). Besonders die densitometrische Auswertung in Abbildung 42C verdeutlicht die signifikante Minderung in der Expressionsstärke von Stäbchenrhodopsin nach der Unterdrückung von endogenen GDNF. Das Expressionsmuster von Stäbchenrhodopsin nach der Transfektion mit der GDNF*antisense*-Sequenz zeigte an den ersten drei untersuchten Kulturtagen 5, 7, 9 (48 h post Transfektion) eine deutliche Verminderung in der Signalstärke, obwohl die relative Expression weiterhin 8-12% betrug. An den folgenden Kulturtagen verringerte sich die Expression noch weiter auf 2% an den Kulturtagen 11 und 13 (48 h post Transfektion) (Abbildung 42B, C).

4.2.5 Die Unterdrückung von GDNF verringert die Zahl der Stäbchen, aber nicht der Zapfen

Um die Erkenntnisse aus Gliederungspunkten 4.1.4.1 und 4.2.4 zu vertiefen, wurden erneut Rosettensphäroide mit dem unveränderten und mit der GDNF*antisense*-Sequenz an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 für mindestens 12 Stunden transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden post Transfektion wurden die Sphäroide jeweils geerntet und für die Herstellung von Gefrierschnitten fixiert. Mittels Doppel-Immunfärbungen gegen Photorezeptoren, mit dem Stäbchenspezifischen monoklonalen Antikörper Rho4D2 und dem Zapfenspezifischen polyklonalen Antikörper CERN906, wurden sowohl Stäbchen als auch rote und grüne Zapfen an den selben Schnitten angefärbt. Für eine Quantifizierung wurden zusätzlich die Zellkerne mit DAPI angefärbt.



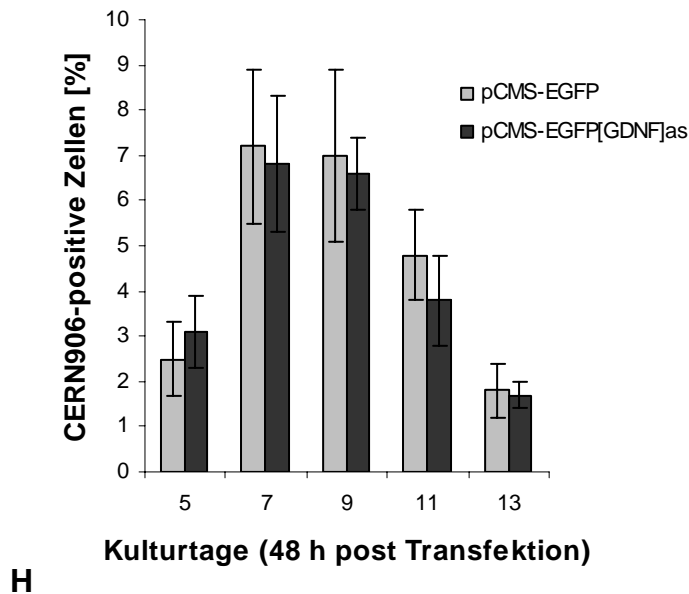


Abbildung 43. Der Effekt der Unterdrückung von endogenen GDNF auf die Zellzahlen der Photorezeptoren. Doppel-Immunfärbungen mit dem Stäbchen-spezifischen Antikörper Rho4D2 und dem Zapfen-spezifischen Antikörper CERN906 an transfizierten Rosettensphäroiden des Kulturtages 9 (48 h post Transfektion). Für eine Quantifizierung der Zellzahlen an den Kulturtagen 5, 7, 9, 11 und 13 (48 h post Transfektion) wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. **A:** Dapi-Färbung eines Rosettensphäroids, der mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektors transfiziert wurde. **B:** Gezeigt ist die Immunfärbung eines Kontrollsphäroids, mit dem Antikörper Rho4D2, der spezifisch gegen Stäbchen gerichtet ist. **C:** Kontrollsphäroid, angefärbt mit CERN906, der spezifisch rote und grüne Zapfen anfärbt. **D:** DAPI-Zellkernfärbung eines mit der *GDNFantisense*-Sequenz transfizierten Rosettensphäroids. **E:** Immunfärbung gegen Stäbchen in Rosettensphäroiden, die mit der *GDNFantisense*-Sequenz transfiziert wurden, zeigt im Vergleich zur Kontrolle weniger detektierbare Stäbchen. **F:** Die Immunfärbung gegen rote und grüne Zapfen lässt, im Vergleich mit der Kontrolle, keine Unterschiede in den Zellzahlen der Zapfen, nach der Unterdrückung von GDNF, erkennen. **G:** Quantifizierung der Stäbchen nach Transfektion mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor und nach Transfektion mit der *GDNFantisense*-Sequenz an den Kulturtagen 5, 7, 9, 11 und 13 (48 h post Transfektion). Deutlich zeigt sich die Minderung in den Zellzahlen der Stäbchen, nach der Unterdrückung von endogenen GDNF. **H:** Quantifizierung der detektierten roten und grünen Zapfen in Kontrollen und nach der Unterdrückung von endogenen GDNF. Das Diagramm über die Kulturtage 5, 7, 9, 11 und 13 (48 h post Transfektion) zeigt keine bemerkenswerten Unterschiede in den Zellzahlen der Zapfen. Balken = 100 µm.

Im Vergleich mit den Kontrollkulturen (Abbildung 43A, B), konnte in den mit der *GDNFantisense*-Sequenz transfizierten Rosettensphäroiden eine geringere Anzahl an Stäbchen mittels Immunfärbungen mit dem spezifischen Antikörper Rho4D2 nachgewiesen werden (Abbildung 43D, E). Für die Quantifizierung wurden die Rho4D2-positiven Zellen pro Sphäroid ausgezählt und der prozentuale Anteil an

Stäbchen in Relation zu DAPI-positiven Zellen errechnet. Deutlich zeigte sich hier der Unterschied in den Zellzahlen der Stäbchen. Während in den Kontrollen die Rate der Stäbchen an den Kulturtagen 7 und 9 (48 h post Transfektion) 6-7% erreichte, repräsentierten Kulturen, die mit der GDNF*antisense*-Sequenz transfiziert wurden, zu diesen Entwicklungspunkten lediglich die Hälfte der in Kontrollen detektierten Stäbchen. Überdies hinaus konnten am ersten und letzten untersuchten Kulturtag (Kulturtag 5 und Kulturtag 13; 48 h post Transfektion), nach der Unterdrückung von endogenen GDNF, keine Stäbchen mehr nachgewiesen werden, während in Kontrollen zumindest 0,5% Stäbchen noch zu detektieren waren.

Ganz anders zeigte sich die Situation bei den Zapfen: Konnte doch ein starker Effekt der Unterdrückung von GDNF für die Zellzahlen der Stäbchen nachgewiesen werden, zeigten sich bei den Zapfen keine nennenswerten Unterschiede. Die Zellzahlen der Zapfen in Kontrollen und in mit der GDNF*antisense*-Sequenz transfizierten Sphäroide unterschieden sich nach der densitometrischen Quantifizierung um lediglich 0,5% (Abbildung 43H). Unter beiden Kulturbedingungen konnten die meisten Zapfen an den Kulturtagen 7 und 9 (48 h post Transfektion) mit 6,5–8% nachgewiesen werden. Mehr noch, an dem Kulturtag 5 (48 h post Transfektion) konnte unter beiden Transfektionsbedingungen Zellzahlen für Zapfen von 2,5-3% detektiert werden und an Kulturtag 13 (48 h post Transfektion) waren noch bis zu 2% aller Zellen CERN906-positiv.

Die hier beschriebenen Ergebnisse und die in Gliederungspunkt 4.2.4 erläuterten Ergebnisse unterstreichen die bedeutende Rolle von GDNF für entwickelnde Stäbchen *in vitro*.

4.2.6 Die Unterdrückung von GDNF vermindert die Anzahl der Islet-1 positiven Zellen

Neben den Photorezeptoren sollten unter anderem auch andere Zelltypen der Retina untersucht werden, bzw. welche Auswirkungen die endogene Unterdrückung von GDNF für deren Entwicklung haben wird. Bisher ist noch kein Marker bekannt, der im Rosettensphäroidsystem spezifisch nur Ganglienzellen detektiert. Insofern erstellt sich der Nachweis von Ganglienzellen nur bedingt ein. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörper Islet-1 können Ganglienzellen angefärbt werden, aber auch eine Subpopulation von Amakrinzellen, so genannten *displaced* Amakrinzellen. Für

eine Quantifizierung der Zellzahlen für Islet-1-positive Zellen wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI angefärbt.

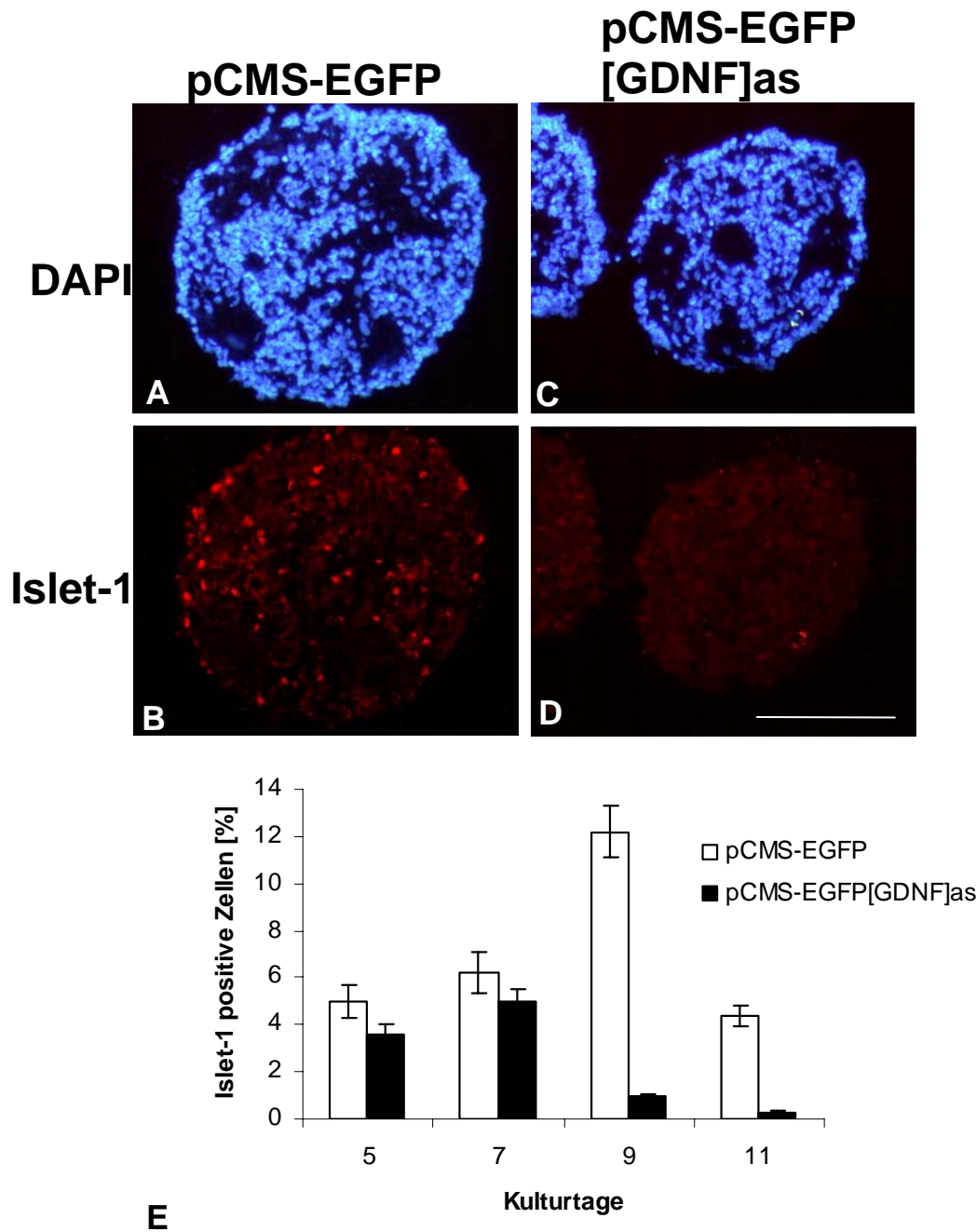


Abbildung 44. Der Effekt der Unterdrückung von endogenen GDNF auf Islet-1 positive Zellen. Immunfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper Islet-1 an transfizierten Rosettensphäroiden des Kulturtages 9 (48 h post Transfektion). Für eine Quantifizierung der Zellzahlen an den Kulturtagen 5, 7, 9 und 11 (48 h post Transfektion) wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. **A:** DAPI-Färbung eines Rosettensphäroid, der mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektors transfiziert wurde. **B:** Gezeigt ist die Immunfärbung eines Kontrollsphäroids, mit dem Antikörper Islet-1 **C:** DAPI-Zellkernfärbung eines mit der GDNF*antisense*-Sequenz transfizierten Rosettensphäroids. **D:** Immunfärbung der Islet-1-

positiven Zellen in Rosettensphäroiden, die mit der GDNFantisense-Sequenz transfiziert wurden, zeigt im Vergleich zur Kontrolle weniger detektierbare Islet-1 positive Zellen. **E:** Quantifizierung der Islet-1 positiven Zellen nach Transfektion mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor und nach Transfektion mit der GDNFantisense-Sequenz. an den Kulturtagen 5, 7, 9 und 11 (48 h post Transfektion). Deutlich zeigt sich signifikante Abnahme in den Zellzahlen der Islet-1 positiven Zellen nach der Unterdrückung von endogenen GDNF. Balken = 100 µm.

Die endogene Unterdrückung von GDNF führte zu einer signifikanten Abnahme der Islet-1 positiven Zellen. Die Immunfärbungen zeigten in den transfizierten Sphäroiden deutlich weniger gefärbte Zellen. Die Quantifizierung in Abbildung 44E verdeutlicht die Effekte der Unterdrückung von GDNF: Während, im Vergleich zu den Kontrollen, in den ersten beiden untersuchten Kulturtagen 5 und 7 (48 h post Transfektion) 1-2% weniger Islet-1 positive Zellen zu detektieren waren, zeigte sich die Situation an Kulturtag 9 dramatisch: In Kontrollen konnten über 12% Islet-1 positive Zellen nachgewiesen werden. Jedoch nach der Unterdrückung von endogenen GDNF waren lediglich 1% der Zellen Islet-1 positiv. An dem letzten analysierten Kulturtag 11 konnte eine vergleichbare Situation detektiert werden. Doch hat zu diesem Zeitpunkt die Anzahl der Islet-1 positiven Zellen auch in den Kulturen, die mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor transfiziert wurden, signifikant abgenommen. Während in den transfizierten Kontrollen dennoch 4% Islet-1-positiven Zellen detektiert werden konnten, waren in den mit der GDNFantisense-Sequenz transfizierten Kulturen weniger als 0,5% islet-1 positiv.

4.2.7 Der *Knock-down* von GDNF unterdrückt die Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA

Nachdem im Gliederungspunkt 4.1.5.3 gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von exogenen GDNF die Expression der Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte, bzw. die Expression früher eintrat, sollte in diesem Abschnitt geklärt werden, welchen Effekt die Unterdrückung von endogenen GDNF für die Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA in Rosettensphäroiden bedeuten würde. Dafür wurden erneut Rosettensphäroide zum einem mit dem unveränderten Vektor und mit der GDNFantisense-Sequenz zu den Kulturtagen 2, 4, 6, 8 und 10 für 12 Stunde transfiziert. Weitere 48 Stunden später wurden die Sphäroide jeweils gesammelt und für die RNA-Isolierung bereitgehalten. Die isolierte RNA diente als Matrize für das Umschreiben in cDNA, als

Ausgangsmaterial für eine semiquantitative RT-PCR. Die Amplifikate der Tyrosinhydroxylase (TH) und GAPDH mRNA wurden in einem abschließenden Agarosegel aufgetrennt.

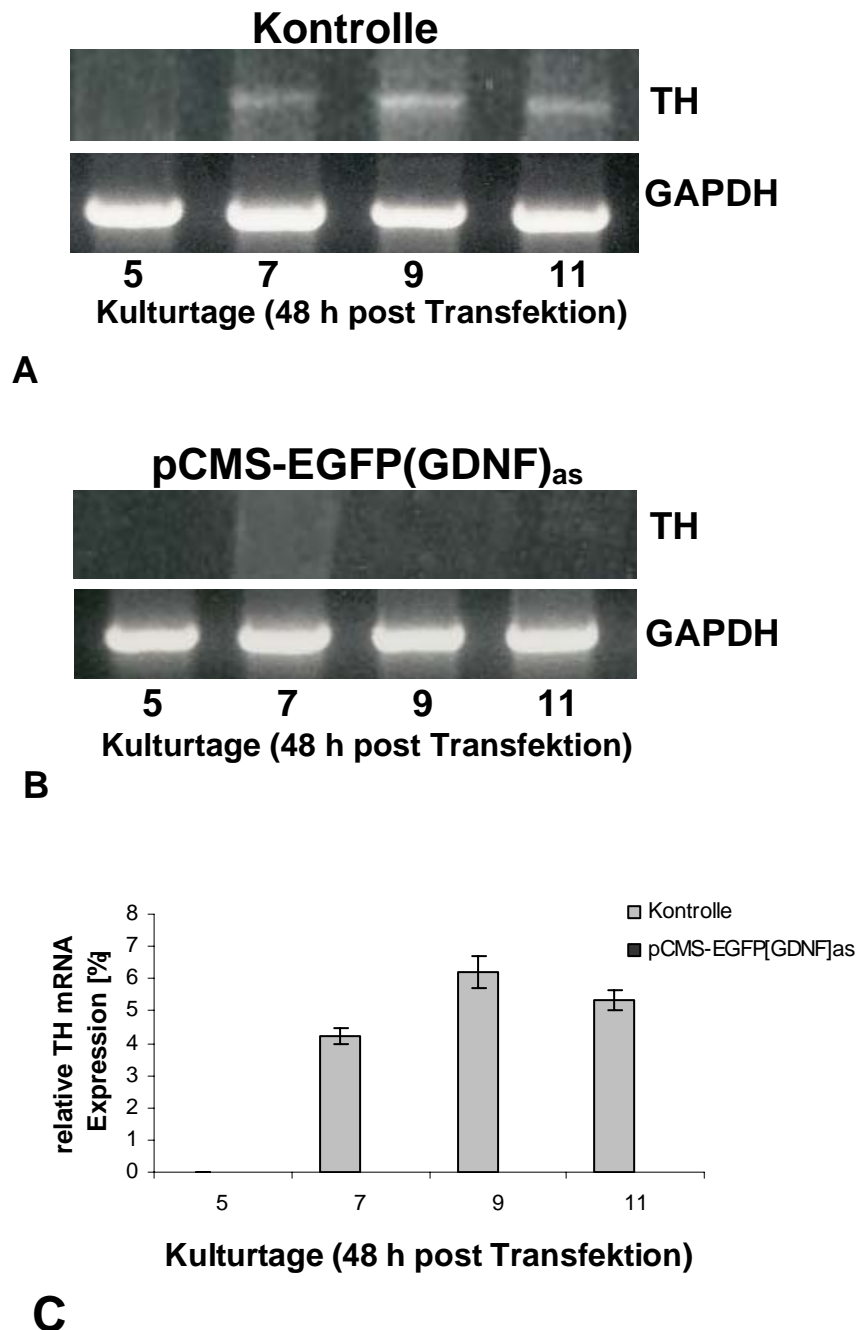


Abbildung 45. Temporale Expression von GAPDH und Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA in transfizierten Rosettensphäroiden an den Kulturtagen 5, 7, 9 und 11 (48 h post Transfektion).

A: Gezeigt sind die PCR-Produkte von GAPDH und Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA in Rosettensphäroiden, die mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor transfiziert wurden. **B:** Amplifikate der GAPDH und Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA in Rosettensphäroiden, die mit der GDNF_{antisense}-Sequenz transfiziert wurden. **C:** Densitometrische Quantifizierung von (A) und (B): Die GAPDH-Expression wurde zu den jeweiligen Kulturtagen gleich 100% gesetzt und die relative

Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression in Relation gezogen. Nach der Unterdrückung von endogenen GDNF wird jegliche Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression in Rosettensphäroiden ebenfalls unterdrückt.

Wie schon in Gliederungspunkt 4.1.5.3 gezeigt, besteht zwischen GDNF und der Expression endogener Tyrosinhydroxylase (TH) ein enger Zusammenhang. In den Kontrollkulturen, die mit dem unveränderten pCMS-EGFP-Vektor transfiziert wurden, konnte an den Kulturtage 7 bis 11 (48 h post Transfektion) 4 bis 6 % relative Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression nachgewiesen werden, wie in der densitometrischen Quantifizierung in Abbildung 45C gezeigt. Bemerkenswert auffallend demonstrierte sich jedoch der Effekt der Unterdrückung von endogenen GDNF: In Rosettensphäroiden, die mit der GDNF*antisense*-Sequenz transfiziert wurden, wurde jegliche Tyrosinhydroxylase (TH) mRNA-Expression unterdrückt (Abbildung 45B, C).

5 DISKUSSION

5.1 Neurotrophe Faktoren als bedeutende Vermittler für Entwicklungsprozesse

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, welche unterschiedlichen Effekte die einzelnen neurotrophen Faktoren für die unterschiedlichsten Zelltypen haben. Vor allem die Fähigkeit, den programmierten Zelltod aufzuhalten, verspricht äußerst hoffungsvolle Möglichkeiten bei der Findung von Therapien von degenerativen Krankheiten. In den verschiedensten Experimenten, seien es Zellkulturen, denen neurotrophe Faktoren zugegeben wurden, oder diverse Tiermodelle, bei denen direkt die jeweiligen Faktoren in das degenerative Gewebe injiziert bzw. überexprimiert wurden, konnte gezeigt werden, dass der programmierte Zelltod (Apoptose), erfolgreich herunter reguliert werden kann (Azadi et al., 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Verringerung des programmierten Zelltodes für die retinalen Zellen in Rosettensphäroiden überzeugend gezeigt werden. Die aufgehaltene Apoptose spricht für die neuroprotektive Fähigkeit von neurotrophen Faktoren, insbesondere der untersuchten Faktoren GDNF, PEDF und BDNF.

Nicht nur der neuroprotektive Effekt dieser Faktoren wurde bewiesen, es zeigte sich auch ein starker proliferierender Einfluss, vor allem zu frühen Zeitpunkten der Retinaentwicklung *in vitro*, vermittelt durch GDNF, PEDF und BDNF. Insbesondere die Herunterregulation von endogenen GDNF in transfizierten Rosettensphäroiden führte zu einer Verringerung in der Größenausbildung der Sphäroide. Die geringere Größe erklärt sich durch die Gesamtzahl der Zellen in transfizierten Sphäroiden, welche im Vergleich zu Kontrollsphäroiden geringer ausfiel. Die wesentlich kleiner ausgebildeten Sphäroide repräsentieren den Proliferation-inhibierenden Einfluss, durch den Gen-*Knock-down* von GDNF. Im Gegenzug wurden erhöhte Zellzahlen erreicht, wenn GDNF und PEDF, bzw. GDNF und BDNF in Kombination zu den Kulturen exogen appliziert wurden.

Die detaillierten Effekte auf die unterschiedlichen Zelltypen der Retina werden in den folgenden Abschnitten näher erleuchtet.

5.2 Neurotrophe Faktoren fördern die Differenzierung und das Überleben von Photorezeptoren

5.2.1 GDNF fördert das Überleben und die frühe Differenzierung von Stäbchen *in vitro*

Der Verlust von Photorezeptoren, ausgelöst durch die Degeneration von Zellen, ist das finale Ereignis degenerativer Augenkrankheiten wie der Macula Degeneration und Retinitis Pigmentosa, Hauptursache für Blindheit weltweit. Neurotrophe Faktoren, welche Neuronen vor dem Zelltod zu schützen vermögen, repräsentieren eine hoffungsvolle Strategie für eine neuroprotektive Intervention. Verschiedene Studien konnten demonstrieren, dass eine Vielzahl von neurotrophen Faktoren den Zelltod von Photorezeptoren aufhalten können, zumindest im Tiermodell von Retinitis Pigmentosa (Faktorovich et al., 1990, 1992; LaVail et al., 1992, 1998; Cayouette and Gravel, 1997).

In dieser Arbeit wurde der neuroprotektive Effekt von GDNF während der Retinogenese in Rosettensphäroiden detailliert untersucht. Während der Anfertigung der vorliegenden Dissertation wurde bereits publiziert, welche starken Effekte GDNF auf Proliferation, Differenzierung und Überleben von Stäbchen hat (Rothermel und Layer, 2003). GDNF steigerte nicht nur die Proliferation und verlängerte sie, sondern die Spezifikation von GDNF als mitogener Faktor wurde repräsentiert durch eine steigende Proliferationsrate in einer Dosis-abhängigen Weise. Die Bedeutung von GDNF für Photorezeptoren wird ebenfalls widerspiegelt durch die Expression der Rezeptoren der GDNF-Familie. Der von GDNF bevorzugte Rezeptor GFR α 1 wurde in Photorezeptoren von Mäusen und Ratten identifiziert und der spezifische Rezeptor für Persephin, GFR α 4 wird in mindestens einer Subpopulation von Photorezeptoren im Huhn exprimiert (Jing et al., 1996; Volpert, 2002; Rothermel et al., 2003). Aber auch die Signal-weiterleitende Rezeptoruntereinheit cRET wurde in inneren und äußeren Segmenten bei Mäusen identifiziert (Jomary et al., 1999).

Der Überlebens-fördernde Effekt von GDNF wurde für bestimmte Zelltypen der Retina, insbesondere für Photorezeptoren, in zahlreichen Studien belegt (Klocker et al., 1997; Ogilvie et al., 2000, Yan et al., 1999). Der Stäbchen-spezifische Effekt wurde durch mehrere Autoren beschrieben (Koeberle und Ball, 1998; Politi et al., 2001). GDNF zeigte die Fähigkeit, die Degeneration von Stäbchen in Mäusen und

transgenen Ratten (im Model von Retinits Pigmentosa) aufzuhalten (Frasson et al., 1999; McGee Sanftner et al., 2001). Darüber hinaus werden die Überlebenszeit und die Erhaltung der Funktionen der äußeren Segmente der Stäbchen durch GDNF signifikant erhöht. Der Zustand der äußeren Segmente ist ein wichtiger Indikator für den funktionellen Status von Photorezeptoren. Sind die äußeren Segmente in ihrer Organisation gestört, können Lichtsignale schlecht oder kaum verarbeitet werden.

Die Resultate aus dieser Arbeit unterstützen und vervollständigen die Erkenntnisse der vorangegangenen Studien. Insbesondere die Erforschung auf der Ebene der Genexpression erlaubte detaillierte Einblicke in die GDNF-Funktionen während der Retinogenese *in vitro*. Die Zugabe von exogenen GDNF zu Rosettensphäroiden führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von Rhodopsin. Während in Kontrollen die Expression mit zunehmenden Kulturtagen abnahm, wurde eine starke Expression von Rhodopsin mRNA in den GDNF-behandelten Sphäroiden über die verbleibende Kultivierungsdauer beibehalten. Um Überlebenseffekte von GDNF noch weiter zu ergründen, wurden in der vorliegenden Arbeit so genannte *loss-of-function*-Experimente durchgeführt, bei denen mittels einer *Antisense*-Strategie das Gen für GDNF endogen herunterreguliert wurde. Die Effizienz der Methode zeigte sich in einem nahezu vollständigen *Knock-out* von endogenen GDNF. Ebenfalls stark betroffen durch den Gen-*Knock-down* war die Expression von endogenen Rhodopsin, welches im Vergleich zu den Kontrollen erheblich verringert war. Die Expression erreichte lediglich die Hälfte der Intensität der Kontrollen. Diese Erkenntnisse wurden ebenfalls durch den immun-histochemischen Nachweis bestätigt. Nach der Herunterregulation von GDNF wurden wesentlich weniger Stäbchen detektiert. Demnach wurden folglich weniger Stäbchen differenziert. Schließlich konnten an dem letzten untersuchten Kulturtag keine Stäbchen mehr nachgewiesen werden, während in Kontrollen noch welche vorhanden waren.

Die beschriebenen Effekte sind Stäbchen-spezifisch, Zapfen erscheinen unbeeinträchtigt. Ähnliche Effekte, welche Zapfen-unabhängig sind, konnten bereits für den Faktor CNTF gezeigt werden (Fuhrmann et al., 1995). Der Stäbchen-spezifische Effekt kann unter anderem über das Alter der verwendeten retinalen Zellen für die Produktion von Rosettensphäroiden (Embryonaltag 6) erklärt werden. Stäbchen treten relativ spät erst in ihrer Entwicklung auf, während zu diesem

Zeitpunkt Populationen von Zapfen bereits postmitotisch sind. Zapfen-Vorläuferzellen könnten demnach zu diesem Zeitpunkt unsensitiv für GDNF sein. Jedoch wurde dieser Stäbchen-spezifische Effekt in der Literatur mehrfach als Alters-unabhängig beschrieben. Demnach muss der Stäbchen-spezifische Effekt auf die Abhängigkeit der Stäbchen von extrinsischen Signalen bezogen werden (Yang et al., 2004). Die Entwicklung der Photorezeptoren ist autonom. Wie oben erwähnt, entwickeln sich Zapfen vor den Stäbchen, und deren Entwicklung ist wiederum abhängig von extrinsischen Signalen wie Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Kontakte (Althuler und Cepko, 1992; Layer et al., 1997; Adler et al., 2001; Levine et al., 2000; Rothermel und Layer, 2001). Der Erhalt der Zapfen ist allerdings wiederum abhängig von der Präsenz der Stäbchen.

Welche Mechanismen diesen Effekten zugrunde liegen, welche zu Überleben von Stäbchen und Zapfen führen, ist noch nicht ausreichend geklärt. Doch legt die aktuelle Forschung Schwerpunkte auf die Aufklärung des Signalweges der Wirkung von Faktoren, der den Zelltod der lichtempfindlichen Photorezeptoren aufhalten kann. Weltweit sind 1.500.000 Menschen von Retinitis Pigmentosa betroffen. Bei Retinitis Pigmentosa degenerieren die Stäbchen, welche für das Sehen in der Dunkelheit und das periphere Sehen verantwortlich sind. Die Menschen werden nachtblind und das periphere Sehfeld verschwimmt. Die Patienten bekommen einen so genannten „Tunnel-Blick“. In zweiter Instanz degenerieren die Zapfen, welche für das Farben-, Kontrast- und Tiefensehen, sowie die meisten Sehfunktionen bei Tageslicht verantwortlich sind. Schreitet die Krankheit voran, erblinden die Betroffenen vollkommen. Die meisten Patienten konsultieren einen Arzt erst dann, wenn die Degeneration der Stäbchen bereits eingetreten ist. Die bisherigen Therapieansätze beschäftigten sich mit dem Einsatz von neurotrophen Faktoren, insbesondere GDNF, um den Stäbchenverlust zu verhindern. Neue Therapien müssen schließlich das Überleben der Zapfen beinhalten, um die völlige Blindheit aufzuhalten. Da Zapfen erst absterben, wenn Stäbchen schon degeneriert sind, geht man davon aus, dass Stäbchen einen Faktor abgeben, der im gesunden Zustand Zapfen am Überleben erhält. Die Gruppe um Thierry Lévillard und José Sahel hat sich auf die Suche nach solch einem Faktor begeben. Ihr ist es gelungen, einen Faktor zu identifizieren, der von den Stäbchen exprimiert wird und nannten ihn *rod derived cone viability factor* (Lorentz et al., 2006). Die Eigenschaften dieses Faktors

stimmen mit allen potentiellen Fähigkeiten eines Zapfen-spezifischen Überlebensfaktors überein. Dieser wird von Stäbchen sekretiert, hat protektive Eigenschaften für Zapfen, und verliert seine Expression nachdem Stäbchen bereits abgestorben sind. Über diesen Faktor erhofft man sich, den sekundären Zapfenverlust in Retinitis Pigmentosa aufhalten zu können.

Folgende Darstellung soll den gedachten Mechanismus, der zum Überleben von Stäbchen und Zapfen führt, verdeutlichen:

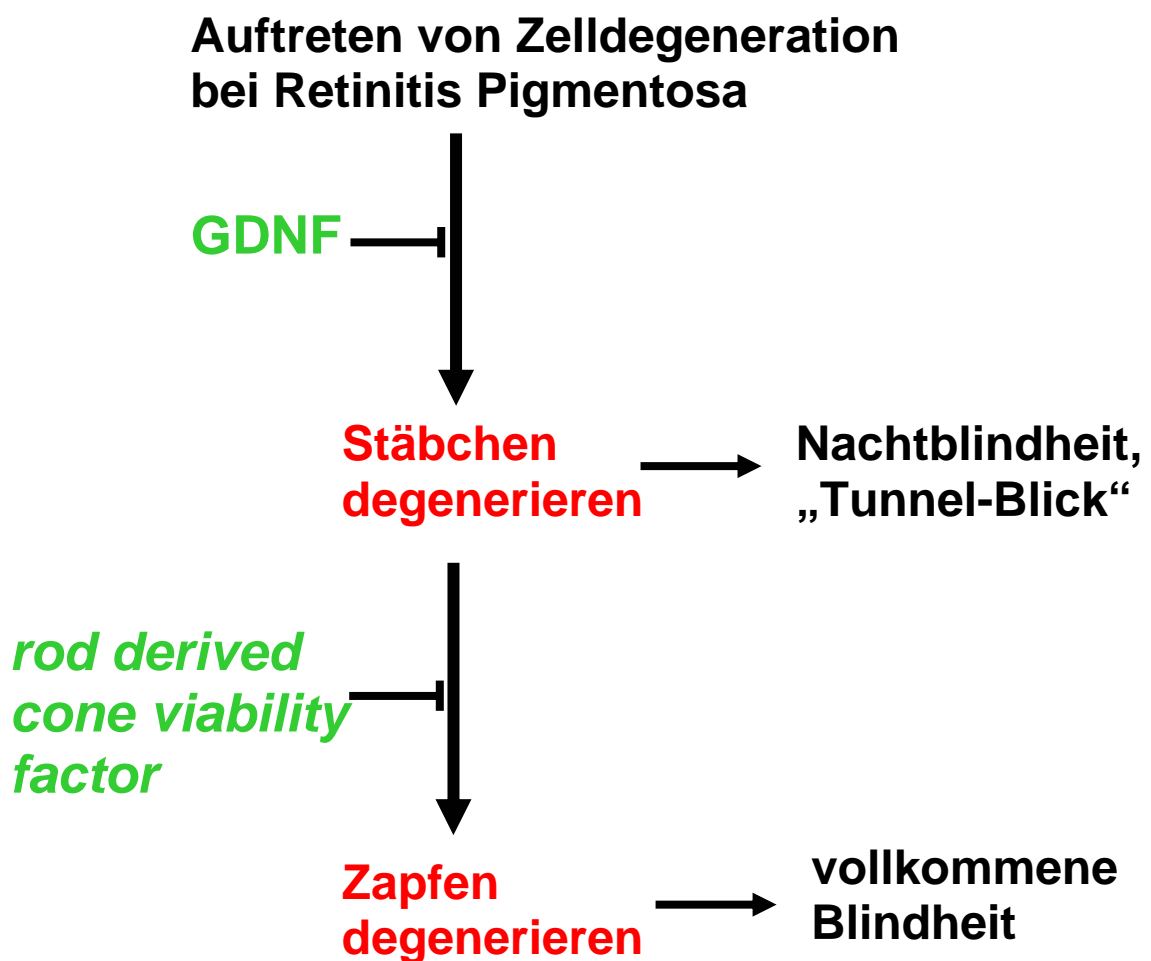


Abbildung 46. Zelldegeneration von Photorezeptoren, welche Retinitis Pigmentosa zugrunde liegt, könnte durch den Einfluss von neurotrophen Faktoren aufgehalten werden. Der Zelltod von Stäbchen kann durch den Einfluss von GDNF aufgehalten werden. Stäbchen selbst exprimieren und sekretieren den *rod derived cone viability factor*, der wiederum die Degeneration von Zapfen aufhalten kann.

5.2.2 PEDF wirkt prodifferenzierend auf Zapfen

Die Bedeutung von PEDF für die Retina und insbesondere für ihre Entwicklung ist bisher unzureichend geklärt. Es gibt einige Hinweise, dass PEDF eine Schutzfunktion auf Müller- und Ganglienzellen ausübt und diese vor dem Zelltod schützen kann (Li et al., 2006). Es konnte auch gezeigt werden, dass Müller- sowie Ganglienzellen PEDF ebenfalls exprimieren und auch sekretieren (Behling et al., 2002; Eichler et al., 2004). PEDF, in betroffenes Gewebe injiziert, führte zu einer signifikanten Protektion der Photorezeptoren (Cao et al., 2001; Imai et al., 2005) und verlangsamte den Tod von Photorezeptoren in einem Model von vererbter retinalen Degeneration (Cayouette et al., 1999). In einem anderen Model wurde PEDF intravitreal in Ratten injiziert, bei welchem Zelltod der Photorezeptoren durch Licht induziert wurde. Wichtig war, dass PEDF vor Einsetzen des Lichts zugegeben wurde, erst dann konnten protektive Effekte nachgewiesen werden. Andere Experimente zeigten, dass PEDF retinale Neuronen vor oxidativen Stress schützen kann (Cao et al., 1999).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die äußeren Segmente der Photorezeptoren nach Entfernung des RPEs erheblich gestört sind. Die Interaktionen zwischen RPE und Retina sind entscheidend für die strukturelle und funktionelle Differenzierung der Photorezeptoren (Hollyfield und Witkovsky, 1974). Aus dem RPE sekretierte Proteine beeinflussen das Überleben von Photorezeptoren positiv (Gaur et al., 1992; Sheedlo et al., 1992, 1998). Die Gruppe um Jablonski zeigte, dass wenn das RPE entfernt wurde, daraufhin aber PEDF zum funktionell beeinflussten Gewebe zugegeben wurde, die Ultrastruktur der Photorezeptoren, die Membranzusammensetzung der äußeren Segmente und die Opsinexpression wieder einen funktionellen Zustand einnahmen (Jablonski et al., 2000). Diese Effekte können unter anderem PEDF zugeschrieben werden, welches vom RPE sekretiert wird.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen für die Photorezeptoren differenzierte Effekte, ausgeübt durch PEDF: Für die Stäbchen erwies sich die Situation in der späten Entwicklung von Rosettensphäroiden als dramatisch. Die Zugabe von PEDF führte zu einer Minderung der Zellzahlen von Stäbchen. Lediglich ein Drittel der in Kontrollen identifizierten Stäbchen konnte in den PEDF-behandelten

Kulturen nachgewiesen werden. Die Apoptose scheint zu diesen späteren Entwicklungszeitpunkten (Kulturtag 8 und 10) durch den Einfluss von PEDF gefördert zu werden. Gegensätzlich dazu zeigte sich die Situation zu frühen Zeitpunkten: Am Kulturtag 4 war die Zellzahl für Stäbchen gegenüber den Kontrollen erhöht. Zu diesem Zeitpunkt ist ein prodifferenzierender Einfluss festzustellen. Unterstützt werden diese Resultate auf der transkriptionellen Ebene: Die semi-quantitative RT-PCR zeigte an Kulturtag 4 eine signifikant starke Expression für Rhodopsin, die an den folgenden Kulturtagen kaum mehr zu identifizieren war.

Im Kontrast dazu zeigten sich die Effekte von PEDF auf die Zapfen. Wie immunhistochemisch demonstriert, wurden unter der Zugabe von PEDF, wesentlich mehr Zapfen differenziert. Die Expressionsstudien der einzelnen Opsine unterstützen ebenfalls diese Ergebnisse. PEDF stimuliert vor allem die frühe Differenzierung von grünen und blauen Zapfen, sowie die späte Differenzierung und das Überleben von roten, grünen und violetten Zapfen. PEDF fungiert demnach als Überlebensfaktor, aber noch bedeutender, als Differenzierungsfaktor für Zapfen. Diese prodifferenzierenden und Apoptose-fördernden Effekte für PEDF sind bekannt, wenn auch im anderen Zusammenhang. Denn eben gerade diese Eigenschaften, kombiniert mit antiangiogenen und antiproliferierenden Eigenschaften verleihen PEDF ein besonders großes Anti-Tumorpotential (Fernandez-Gracia et al., 2007; Ek et al., 2006).

Wie lässt sich der differenzierte Effekt auf Stäbchen und Zapfen erklären?

Da die Resultate der vorliegenden Arbeit vor allem den Zapfen einen fördernden Einfluss zuschreiben, scheint PEDF schwerpunktmäßig Zapfen zu differenzieren. Aufgrund des Überschusses an Vorläuferzellen, der schließlich zu Zapfen differenziert wird, ergibt sich im Gegenzug eine für Stäbchen entsprechend geringere Differenzierung. Zudem scheint PEDF zu späteren Entwicklungszeitpunkten die Differenzierung oder auch das Überleben der Stäbchen aktiv zu hemmen.

Durch PEDF ausgelöste Überlebensfunktionen für Photorezeptoren konnten, wie erwähnt, mehrfach gezeigt werden. Jedoch konnte bisher nicht geklärt werden, ob dieser Effekt Stäbchen- oder Zapfen-spezifisch ist. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine Spezifikation von PEDF für Zapfen gezeigt werden. Eine andere unterstützende Studie konnte ebenfalls für Stäbchen einen sich negativ

auswirkenden Effekt nachweisen. Die Gruppe um Carwile verabreichte PEDF zu Zellkulturen, und konnte daraufhin beobachten, dass die äußeren Segmente der Stäbchen schneller kollabierten (Carwile et al., 1998).

5.2.3 GDNF kompensiert Effekte von PEDF

Für Photorezeptoren konnten vor allem in Bezug auf die Stäbchen ganz unterschiedliche Effekte aufgezeigt werden, welche durch GDNF und PEDF ausgelöst werden. Während GDNF sich Überleben-fördernd für Stäbchen präsentierte, wurden in der vorliegenden Arbeit Stäbchen durch den Einfluss von PEDF anscheinend in den Zelltod getrieben. Dafür konnte ein starker prodifferenzierender Effekt auf Zapfen gezeigt werden, vermittelt über PEDF. Die Literatur zeigt viele Hinweise auf die Notwendigkeit des Zusammenwirkens von mehreren neurotrophen Faktoren. Faktoren für sich alleine zeigten diverse Effekte, diese können jedoch durch die Kombination von mehreren Faktoren potenziert werden.

Die Kombination von GDNF und PEDF führte in späteren Kulturstadien zu ganz gegensätzlichen Effekten: An Kulturtag 8 wurden lediglich halb so viele Stäbchen nachgewiesen, verglichen mit den Kontrollen. Am Kulturtag 10 änderte sich die Situation dramatisch. Zu diesem Zeitpunkt wurden nahezu doppelt so viele Stäbchen detektiert, nachdem Kulturen mit GDNF und PEDF in Kombination behandelt wurden. Das heißt, das Bild an Kulturtag 8 erinnert an den Einfluss von PEDF, der die Stäbchen inhibiert. An Kulturtag 10 setzt sich dann wieder der durch GDNF ausgelöste Stäbchen-stimulierende Effekt durch. Der PEDF-Effekt wird durch GDNF kompensiert.

Wie lassen sich diese gegensätzlichen Effekte erklären? Am Kulturtag 8 erscheinen Stäbchen wesentlich sensibler für PEDF, als für GDNF. Mehr noch, PEDF zeigt zu diesem Zeitpunkt einen hemmenden Einfluss auf die Differenzierung von Stäbchen zu haben. An Kulturtag 10 scheint jegliche Sensitivität für PEDF verloren gegangen zu sein. Die Differenzierung, und vor allem das Überleben zu diesem Zeitpunkt, werden durch GDNF gefördert und wesentlich erhöht. Das heißt, der antidifferenzierende Effekt von PEDF wird abgelöst durch den prodifferenzierenden, und vor allem den Überleben fördernden Effekt, von GDNF.

Im Kontrast dazu erwies sich die Situation für die Zapfen: Zapfen repräsentierten sich erheblich sensitiver für PEDF als vergleichsweise Stäbchen. Ähnlich wie in den mit PEDF behandelten Kulturen, konnten an Kulturtag 8, erheblich mehr Zapfen, gegenüber den Kontrollen, detektiert werden, nachdem Kulturen mit GDNF und PEDF in Kombination behandelt wurden. Am Kulturtag 10 ist keine Steigerung der Zellzahlen für Zapfen mehr nachweisbar, wie es aber in PEDF-behandelten Kulturen der Fall war. In der Kombination mit GDNF scheint hier nun ein von GDNF ausgeübter Effekt einzusetzen, der die Determination von Zapfen (zum Vorteil von Stäbchen) indirekt hemmt, indem mehr Stäbchen differenziert werden. In diesem Falle tritt hier der Stäbchen-spezifische Effekt von GDNF ein, der PEDF entgegenwirkt, bzw. ausgleicht. Um diese hochspezifischen Effekte zwischen Überleben und Differenzierung für die untersuchten Faktoren detailliert aufzuklären, bedarf es der Überprüfung der Entwicklungszustände an den Kulturtagen 6 und 12.

5.2.4 Effekte von GDNF werden durch BDNF potenziert

Die Resultate aus der Behandlung von GDNF und BDNF in Kombination, ähneln sehr stark denen nach der alleinigen GDNF-Behandlung. Durch den zusätzlichen Einsatz von BDNF wurden die bekannten und schon beschriebenen Effekte von GDNF jedoch verstärkt. Vor allem an Kulturtag 10 werden mehr Stäbchen differenziert und am Überleben gehalten als an Kulturtag 8. Ähnlich zeigte sich auch das Bild für die Zapfen. Die alleinige Zugabe von BDNF zu Rosettensphäroiden zeigte keine signifikanten Effekte auf die Photorezeptoren, es konnten aber in der Kombination mehr Zapfen nachgewiesen werden, als in den GDNF-behandelten Sphäroiden. GDNF-Effekte werden demnach durch den Einfluss von BDNF gesteigert. Die Mechanismen die diesem Effekt zugrunde liegen könnten, werden noch erläutert.

Die Notwendigkeit für den Einfluss mehrerer Faktoren ist für die verschiedensten Zellpopulation beschrieben. Subpopulationen von sensorischen Neuronen oder auch Motorneurone sind auf eine simultane Aktivität von GDNF und BDNF während der fetalen Entwicklung *in vivo* angewiesen (Erickson et al., 2001). Verschiedene Studien zeigten, dass eine Vielzahl von Populationen an peripheren Neuronen mehr als nur einen Faktor während ihrer Entwicklung benötigen (Frittsch

et al., 1997). In vielen Fällen agieren Faktoren sequentiell (Buchman und Davies, 1993; Molliver und Snider, 1997; Hashino et al., 1999). Buchman and Davies (1993) zeigten, dass trigeminale Neurone für ihr Überleben die Funktionen von NT-3 oder BDNF benötigen und dann ihre Bedürfnisse zu NGF wechseln. Dieser Übergang im Bedarf wird dann ebenfalls durch einen Wechsel in der Nutzung der Rezeptoren begleitet. Zahlreiche Studien belegen aber für die Kombination GDNF und BDNF eine simultane Aktion, welche z.B. das Überleben von primären sensorischen Neuronen zur Folge hat (Ericksson et al., 2001). Ebenso zahlreiche potentielle Mechanismen erklären diese simultane Abhängigkeit von GDNF und BDNF. Eine Erklärung wäre, dass beide Faktoren eine Fähigkeit für neuronales Überleben zeigen, aber *in vivo* in so geringen Konzentrationen exprimiert werden, die nicht ausreichen, um signifikante Effekte auszulösen. Erst in der Kombination werden Konzentrationen erreicht, die sich auf diverse Entwicklungsprozesse auswirken. Eine andere These besteht darin, dass beide Faktoren nicht direkt gemeinsam agieren. In diesem Falle würde nur ein Faktor direkt seine Aktionen ausüben und der zweite würde diesen Faktor, und dessen Sensitivität, in parakriner Art und Weise regulieren (Kriegelstein et al., 1998; Schober et al., 1999).

5.2.5 Photorezeptoren und der Bedarf an neurotrophen Faktoren

Die vorangegangenen Abschnitte erläuterten diverse Effekte von GDNF, BDNF und PEDF für die Entwicklung der Photorezeptoren *in vitro*. Einige dieser gezeigten Effekte ähnelten sich in ihren Einfluss, andere erwiesen sich als gegensätzlich. An diesem Punkt angelangt, eröffnen sich zwei Fragen:

Wie lassen sich die beobachteten Resultate in Einklang bringen? Und welche Mechanismen liegen den gezeigten Effekten zugrunde?

GDNF demonstrierte sich als essentieller Überlebensfaktor für Stäbchen. Zapfen werden durch GDNF, zumindest in aktiver Ausübung, nicht beeinflusst. BDNF unterstützt die Überlebensfunktion für Stäbchen von GDNF. Hier kann aber nicht beantwortet werden, ob BDNF direkt, wie GDNF, auf die Stäbchen wirkt, oder indirekt die Expression von GDNF erhöht. Wahrscheinlicher ist die synergetische Aktion von GDNF und BDNF. In vielen anderen Zellkultursystemen und Populationen konnten genau diese synergetischen Funktionen von GDNF und BDNF

nachgewiesen werden (Erickson et al., 2001). Ähnlich Effekte konnte auch für die Kombination GDNF und CNTF gezeigt werden, so wie auch schon für das Überleben von Stäbchen demonstriert. Ebenfalls gibt es zahlreiche Hinweise auf das synergetische Verhalten von BDNF und CNTF (Hashimoto et al., 1999).

PEDF repräsentiert sich als starker Determinierungsfaktor für Zapfen und zeigt ebenfalls neuroprotektive Eigenschaften für Zapfen. Im Kontrast dazu steht eine den Zelltod-fördernde Funktion für die Stäbchen. In der Gesamtheit fördert PEDF vor allem Zapfen.

Die Kombination von Faktoren führte zu anderen Effekten: Der Stäbchen-inhibierende Effekt von PEDF kann durch GDNF ausgeglichen werden. Entweder wird dieser Effekt durch den starken Stäbchen-fördernden Effekt von GDNF direkt ausgeübt, oder indirekt, indem GDNF PEDF selbst parakrin hemmt. Ähnliche Effekte konnten bereits beobachtet werden. Die Gruppe um Carwile konnte zeigen, dass die Zugabe von PEDF zu retinalen Zellkulturen, die äußeren Segmente der Stäbchen schneller kollabierten lässt. Jedoch ist ein gesunder Zustand der äußeren Segmente Grundbedingung für eine korrekte physiologische Funktion der Photorezeptoren. Wurde zu diesen Zellkulturen wiederum noch GDNF hinzu gegeben, konnte der degenerierende Einfluss von PEDF aufgehoben werden (Carwile et al., 1998).

Die folgende Darstellung soll die möglichen Mechanismen des Einflusses von GDNF, PEDF und BDNF auf das Überleben von Photorezeptoren erläutern:

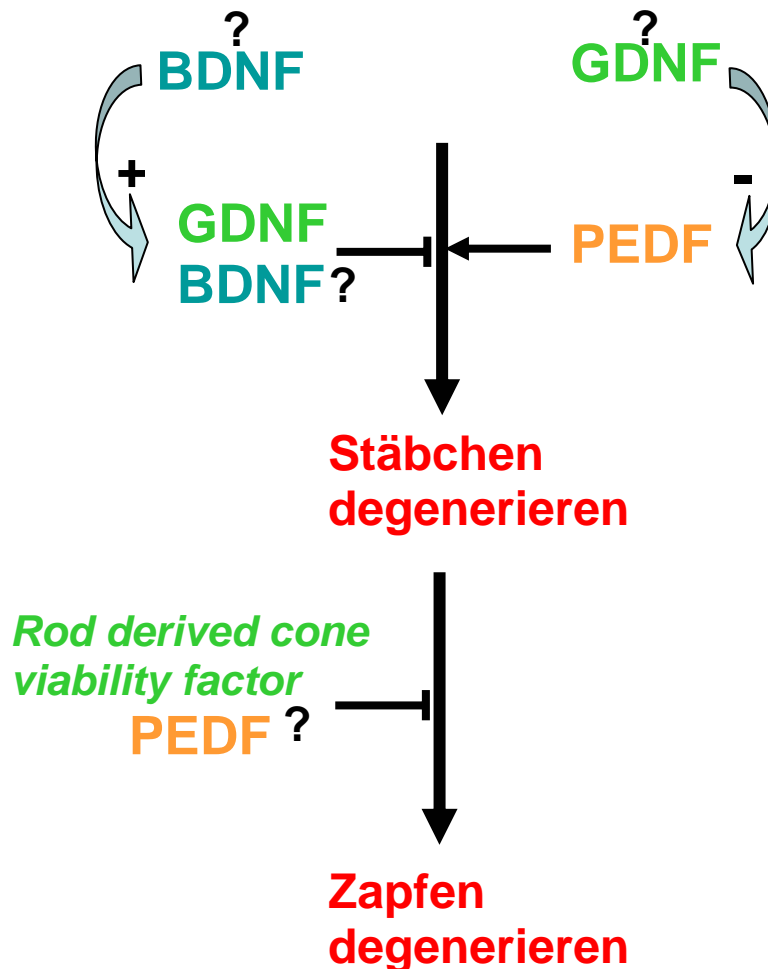


Abbildung 47. Mögliche Mechanismen, welche zum Überleben von Photorezeptoren führen, gefördert oder gehemmt durch neurotrophe Faktoren. Die Degeneration von Stäbchen kann von GDNF, als extrinsisches Signal, aufgehalten werden. Vorrausichtlich wird dieser Effekt direkt durch BDNF verstärkt, oder BDNF wirkt indirekt fördernd über GDNF. Dem gegenüber steht der Einfluss von PEDF. PEDF inhibiert die Differenzierung von Stäbchen. Dies kann aber durch GDNF aufgehalten werden, entweder kompensierend durch den starken Einfluss von GDNF auf Stäbchen oder GDNF wirkt indirekt hemmend auf PEDF. Der sekundär eintretende Verlust von Zapfen kann aufgehalten werden durch *den rod derived cone viability factor* und evtl. durch direkten Einfluss von PEDF.

Es wird noch detailliert versucht zu erklären, ob die Wirkung von GDNF, PEDF und BDNF wirklich direkt vermittelt wird, oder eine indirekte Form der Signalweiterleitung vorliegt.

Die entscheidenden Schlussfolgerungen, die bis zu diesem Zeitpunkt gezogen werden können, sind folgende : i) Photorezeptoren, Stäbchen wie Zapfen (aber vor allem Stäbchen) sind in ihrer funktionellen Erhaltung und ihrem Überleben auf

extrinsische Signale in Form von neurotrophen Faktoren angewiesen ii) trotz ihres eigenen hohen Potentials, zeigen Faktoren in synergetischen bzw. sequentiellen Aktionen mehrerer Faktoren wesentlich höheres neuroprotektives Potential für Photorezeptoren.

5.3 Störende Effekte von PEDF auf die Organisation des Rosettensphäroidsystems werden durch GDNF aufgehoben

Rosettensphäroide charakterisieren sich durch eine besondere Struktur und Organisation. Neben den Rosettenbereichen mit den in zentrischen Kreisen angeordneten Photorezeptoren, finden sich besonders oft IPL-Bereiche wieder. Diese charakterisieren sich durch zellfreie Bereiche mit Fasern von Bipolarzellen, Ganglienzellen und Amakrinzellen. Innerhalb dieser Bereiche befinden sich *displaced* Ganglienzellen. Neben diesen organisierten Bereichen finden sich auch nicht organisierte Bereiche wieder, welche verschiedene Zelltypen und die dazugehörigen Fasern beinhalten. Die Müllerzellen werden im gesamten Rosettensphäroid ausgebildet und tragen zu der Strukturbildung der Sphäroide bei, bzw. sind entscheidend für eine korrekte Organisation eines Rosettensphäroids. Hoch organisiert durchziehen sie Rosetten und IPL-Bereiche. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit glialen Toxinen jegliche Gewebeorganisation in Rosettensphäroiden verhindert (Willbold et al., 2001). Differenzierte Müllerzellen exprimieren Glutaminsynthetase, über deren Nachweis die Detektion der Müllerzellen in der vorliegenden Arbeit erfolgte (Vardimon et al., 1993). Die Glutaminsynthetase ist ausschließlich in den Müllerzellen zu finden, und fungiert als ein Schlüsselenzym beim glialen-neuronalen Neurotransmitter Recycling (Germer et al., 1997).

Die in dieser Arbeit verwendeten Rosettensphäroide wurden nicht wie üblich in 12%igen Medium (Vollmedium) kultiviert, sondern (um die Konzentration von zugegebenen Faktoren zu kontrollieren) im sog. Minimalmedium (d.h. mit lediglich 2% Serum) kultiviert. Ein Effekt dieser Kultivierung ist zunächst die geringere Ausbildung in der Größe der Rosettensphäroiden. Die in Minimalmedium kultivierten Kulturen können auch nicht so lange in Kultur gehalten werden, wie unter der

Kultivierung mit 12% Serum. Zudem ist die Organisation der Sphäroide bei weitem nicht so ausgeprägt, als wenn in Vollmedium kultiviert. Es werden wesentlich weniger Rosetten gebildet. Wenn welche vorhanden sind, sind diese, wie auch die IPL-Bereiche, wesentlich kleiner ausgebildet. Auffällig zeigt sich diese weniger strukturierte Organisation in der Ausbildung der Müllerzellen, welche relativ diffus in den Sphäroiden in Minimalmedium kultiviert, erscheinen. Es entsteht der Eindruck, dass bedingt durch die geringeren Konzentrationen des Mediums, entscheidende Faktoren und Stoffe fehlen, die die Müllerzellen andernfalls fördern würden. Einen zusätzlichen dramatischen Effekt auf die Organisation zeigte der Einfluss von PEDF.

Die Zugabe von exogenen PEDF verhinderte jegliche Bildung von Rosetten. IPL-Bereiche wurden geformt, wenn auch nur äußerst gering in ihrer Größe und Struktur. Störungen der Struktur wurden zusätzlich durch die verringerten Zellzahlen der Amakrinzellen verdeutlicht. Sphäroide waren sehr klein und hatten keine lange Lebensdauer. Diese Desorganisation zeigte sich vor allem in der Ausbildung der Müllerzellen wieder, welche nur gering und extrem diffus ausgebildet wurden.

Wie kann dieser einem glialen Toxin ähnliche Effekt erklärt werden? Bei der Beantwortung dieser Frage stellen sich zunächst Widersprüche ein. Studien belegen, dass PEDF an sich die reguläre Entwicklung von Müllerzellen fördert, nachdem das RPE entfernt wurde (Jablonski et al., 2001). Jedoch zeigen die Resultate der vorliegenden Arbeit einen Müllerzellen-inhibierenden Einfluss von PEDF in dem verwendeten Rosettensphäroidsystem. Diverse mögliche Erklärungen bieten sich an: Zum einem ist die Wirkung jeglichen Stoffes abhängig von dem System, in dem er getestet wird. Wichtig dabei sind auch die eingesetzten Konzentrationen eines Stoffes, z.B. eines neurotrophen Faktors. Das Konzentrationsfenster für den jeweiligen Faktor kann unterschiedlich bemessen sein. Unter einer bestimmten Konzentration hat dieser Faktor keine Effekte. Erst wenn eine bestimmte Konzentration erreicht wird, können diverse Einflüsse ausgemacht werden. Bei einigen Faktoren kann aber auch ein überschwelliger Wert erreicht werden, der dann sogar gegenteilig auf das verwendete System wirken kann. Eventuell liegt so eine Situation für PEDF und das Rosettensphäroidsystem vor. Die verwendete Konzentration von 50 ng/ml erwies sich dann als inhibierend auf Müllerzellen. Die Gruppe um Andreas Reichenbacher hat Hinweise erbracht, dass Müllerzellen selbst PEDF produzieren (Eichler et al., 2004). PEDF sollte dann wiederum eine

vermittelnde Funktion bei der Expression und Produktion anderer neurotropher Faktoren haben. In diesem Zusammenhang läge dann die Vermutung nahe, dass PEDF sich selbst in der verwendeten Konzentration autokrin inhibiert. Für detailliertere Untersuchungen müssten dementsprechende Konzentrationsstudien ausgeführt werden, um mögliche Dosis-abhängigen Effekte von PEDF aufzuklären. Ob aber die damit gezeigten degenerierenden Effekte von PEDF auf die Müllerzellen erklärt werden kann, bleibt offen. Dafür müsste eine mögliche Abhängigkeit der Müllerzellen von PEDF für ihre Erhaltung erst bewiesen sein.

Eine zusätzliche Möglichkeit der Erklärung bietet sich wie folgend an: PEDF, als alleiniger Faktor eingesetzt, könnte einen anderen Faktor aus dem Medium inhibieren, der förderlich und essentiell für die Müllerzellen ist. Betroffene Faktoren, die im Aggregationsmedium enthalten sind, und protektive Auswirkungen auf Müllerzellen haben, müssen noch im Detail identifiziert werden. Als ein möglicher für die Müllerzellen aktivierender Faktor repräsentiert sich CNTF (Goureau et al., 2004). CNTF wird von den Müllerzellen produziert (Kirsch et al., 1997; Ju et al., 1999). Erfolgt eine Läsion des Nervus opticus, wird die CNTF-Expression in den Müllerzellen hochreguliert. Dies geschieht parallel zu einer Aktivierung der Müllerzellen, die wiederum durch eine erhöhte Expression des *glial fibrillary acidid protein* (GFAP), einem prominenten Gliazellmarker, charakterisiert ist (Chun et al., 2000). In der Retina konnte gezeigt werden, dass es nach Injektion von CNTF ins Auge zu einer Aktivierung der Jak/Stat-Signalkaskade kommt, welche sich in einer verstärkten Phosphorylierung von Stat3 äußert. Aktiviertes phosphoryliertes Stat3 findet sich in den Kernen von retinalen Ganglien- und Müllerzellen (Peterson et al., 2000). Die durch die CNTF-Applikation hervorgerufene Aktivierung der retinalen Müllerzellen zeigt sich dann durch eine erhöhte Expression des Gliazell-Markers GFAP (Wahlin et al., 2000; Wang et al., 2002). CNTF wirkt also als Induktor für die Aktivierung von Müllerzellen. Neben CNTF könnte aber auch Laktose einen stimulierenden Einfluss haben, seitdem bekannt ist, dass die Zugabe von Laktose nach der Entfernung vom RPE die Expression von Müllerzell-spezifischen Proteinen fördert (Jablonski und Iannaccone, 2001). Der *epidermal growth factor* (EGF) ist dafür bekannt, Müllerzellen zu verstärken. Vor allem fördert er die Proliferation von Müllerzellen (Sagar et al., 1991; Roque et al., 1992).

GDNF zeigte in der vorliegenden Arbeit einen gegensätzlichen Effekt auf die Ausbildung der Müllerzellen. Während in Kontrollen Müllerzellen am Kulturtag 12 zu degenerieren schienen, konnte die Zugabe von exogenen GDNF die Müllerzellen stimulieren. Die Zugabe von GDNF und PEDF in der Kombination erzeugte andere Ergebnisse für die Ausbildung der Müllerzellen und somit der Rosettensphäroidstruktur, als die Behandlung mit PEDF alleine. Die mit GDNF und PEDF behandelten Sphäroide waren sehr groß ausgebildet, und zeichneten sich durch zahlreiche, große IPL-Bereiche aus. In den IPL-Bereichen können *displaced* Ganglienzellen identifiziert werden. Die Vermutung liegt nahe, dass GDNF wiederum, wie schon für die Stäbchen beschrieben, durch PEDF auf Müllerzellen ausgeübte inhibierende Effekte, aufhebt.

Folgende Darstellung versucht die möglichen Einflüsse von GDNF und PEDF auf Müllerzellen zusammenzufassen:

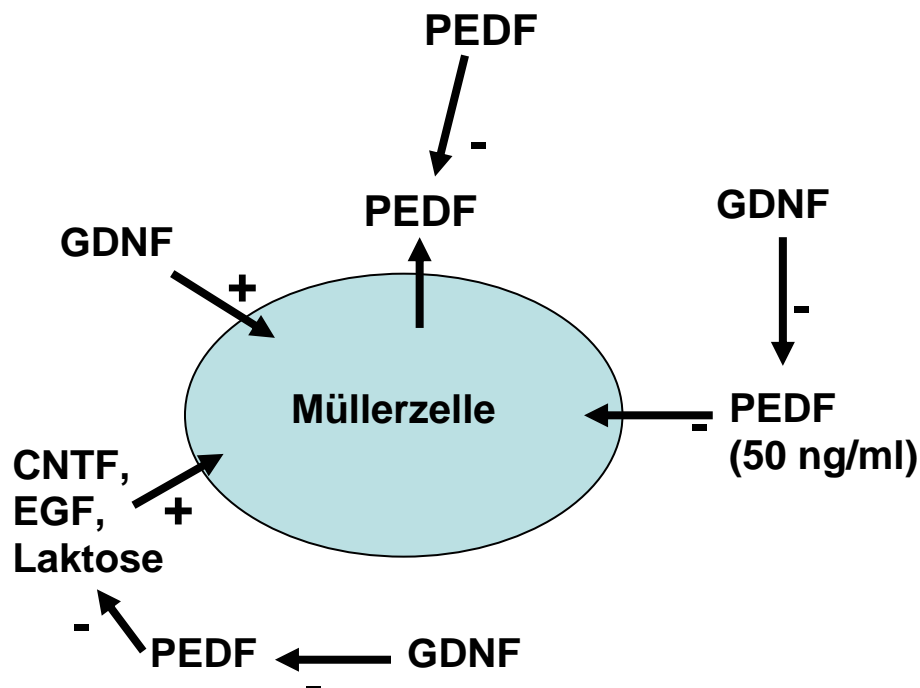


Abbildung 48. Mögliche Mechanismen, ausgelöst durch GDNF und PEDF, für die Ausbildung und Erhaltung von Müllerzellen im Rosettensphäroidsystm. Verschiedene Varianten des Einflusses von GDNF und/oder PEDF auf Müllerzellen können in Betracht gezogen werden. Alle gezeigten Mechanismen könnten auch in synergetischer Funktion vorliegen, so dass nicht ein Mechanismus ausschließlich ultimativ zum Tragen kommt. PEDF wird selbst von den Müllerzellen produziert. PEDF inhibiert in einer bestimmten Konzentration direkt die Müllerzellen und/oder indirekt über die Inhibition eines nicht identifizierten Müllerzellen-stimulierenden Faktors und/oder sich selbst

in autokriner Weise. GDNF kann Müllerzellen direkt fördern und/oder indirekt über den inhibierenden Einfluss auf PEDF.

5.4 GDNF ist essentiell für dopaminerge Amakrinzellen auch in der Retina

Der Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra ist die Ursache für eine der bekanntesten degenerativen Krankheiten, der Parkinsonschen Krankheit (McGeer et al., 1988). GDNF ist bekannt für seine Fähigkeit, diese dopaminergen Neurone vor dem Zelltod zu schützen (Lin et al., 1993; Saarma und Sariola, 1999; Granholm et al., 2000; Erickson et al., 2001). Ähnliche Überlebens-effekte konnte auch für Neurturin, den zweiten Liganden der GDNF-Familie, gezeigt werden, (Hörger et al., 1998). Aufgrund dieser Fähigkeit sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welche Rolle GDNF für die dopaminergen Zellen, eine Subpopulation von Amakrinzellen in der INL, der Hühnerretina spielt.

Der Einfluss von GDNF auf die dopaminergen Neurone in der Retina ist bisher noch nicht ausreichend untersucht, anders als es für zahlreiche andere Faktoren jedoch der Fall ist. Insbesondere die Rolle von BDNF für die dopaminergen Neurone scheint weitgehend geklärt zu sein. Dopaminerge Neurone in der INL zeigten eine sehr starke Immunoreaktivität für TrkB, den spezifischen Rezeptor für BDNF (Hallbook et al., 1996; Cellerino und Kohler, 1997; Kido et al., 2000; Cusato et al., 2002). Mehrere Hinweise eröffneten eine modulierende Funktion von BDNF für das dopaminerge System der Retina. Zusätzlich wurde so die Bedeutung der Nutzung von BDNF als viel versprechendes Werkzeug bei der Therapie von degenerativen Krankheiten (wie der diabetische Retinopathie) offensichtlich. Änderungen im dopaminergen System sind die ersten bekannten Ereignisse im Verlauf dieser Krankheit (Northington et al., 1985; Lieth et al., 2000). Insbesondere die Dichte von dopaminergen Neuronen bei der diabetischen Retinopathie ist erheblich verringert (Seki et al., 2004; Lee et al., 2005). Dopaminerge Neurone in der Retina sind in den verschiedenen Vertebratenklassen homolog, und die Präsenz von TrkB in dopaminergen Amakrinzellen scheint weit konserviert zu sein. Die Dopaminsynthese und -ausschüttung wird durch Licht moduliert (Hallbook et al., 1996). BDNF reguliert im zentralen Nervensystem die Ausschüttung von verschiedenen Neurotransmittern,

inklusive Dopamin. Die BDNF-Synthese in der Retina wird ebenfalls durch Licht moduliert (Lohof et al., 1993; Hyman et al., 1994). Diese Daten unterstützen für BDNF eine modulierende Rolle für die Entwicklung des dopaminergen Systems in der Retina. BDNF vermag, genauso wie GDNF, den Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra zu schützen (Hyman et al., 1991).

Für andere Zelltypen sind Ähnlichkeiten zwischen GDNF und BDNF mehrfach beschrieben, insbesondere was den neuroprotektiven Effekt auf Ganglienzellen betrifft (Koeberle und Ball., 1998; Klocker et al., 1997; Yan et al., 1999). Im Kontrast zu BDNF, sind Effekte von GDNF für dopaminerge Zellen der Retina noch kaum untersucht. Anna Salz versuchte in ihrer Diplomarbeit (2006) Effekte von GDNF auf dopaminerge Zellen in retinalen Explantaten zu untersuchen. Jedoch ist lediglich 1% aller Amakrinzellen dopaminerg. Diese sehr geringe Anzahl an dopaminergen Amakrinzellen begründete das mehrfache Versagen, ausreichend belegende histologische Untersuchungen zu bekommen. So konnten keine immunhistochemischen Beweise für einen Einfluss von GDNF auf die dopaminergen Zellen der Retina erbracht werden. Der Einsatz mehr sensitiverer Methoden sollte Aufklärung bringen: Mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR, konnte in der vorliegenden Arbeit, ein prodifferenzierender und neuroprotektiver Effekt von GDNF für dopaminerge Neurone in der Retina *in vitro* nachgewiesen werden. Die Amplifikation des Geschwindigkeits-Bestimmenden Enzyms der Dopaminsynthese, die Tyrosinhydroxylase, zeigte eine sehr starke Expression der Tyrosinhydroxylase mRNA in GDNF-behandelten Kulturen. Darüber hinaus, erschien die Expression zwei Tage früher und wesentlich intensiver als in den Kontrollkulturen. Diese Daten wurden durch eine weitere hoch sensitive Methode, der *Western-Blot*-Analyse, verifiziert. Der Immunoblot gegen Tyrosinhydroxylase in den Rosettensphäroiden zeigte für das Protein Tyrosinhydroxylase dasselbe Expressionsmuster, wie schon gezeigt für die mRNA in der semi-quantitativen RT-PCR. Mehr noch, der Gen-*Knock-down* von endogenen GDNF unterdrückte jegliche Expression von Tyrosinhydroxylase mRNA. Insofern konnte in dieser Arbeit erstmalig ein nahezu vollständiger *Knock-out* der Tyrosinhydroxylase mRNA gezeigt werden, nachdem endogenes GDNF in Rosettensphäroiden der Hühnerretina *in vitro* herunterreguliert wurde.

Diese Daten unterstützen den starken neuroprotektiven Effekt von GDNF für dopaminerge Neuronen, wie für das Nervensystem in zahlreichen Studien belegt (Lapchack et al., 1997). Einige Studien zeigten ähnliche Effekte auf: GDNF wurde in Ratten injiziert. Nach einer Verletzung konnte damit die Expression von Tyrosinhydroxylase in nigralen dopaminergen Neuronen gesteigert werden (Winkler et al., 1996). Nicht nur für den neuroprotektiven Einfluss ist GDNF bekannt, sondern auch für die Fähigkeit, Differenzierung von verschiedenen Zelltypen des Nervensystems zu fördern (Zihlmann et al., 2005; Bakshi et al., 2006; Tartard et al., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beweisen diesen neuroprotektiven Effekt von GDNF auf die Differenzierung der dopaminergen Amakrinzellen der Retina.

5.5 BDNF ist essentiell für Zellen der inneren Retina

5.5.1 BDNF fördert die Differenzierung und das Überleben von Amakrinzellen

Glaukom, neben Retinitis Pigmentosa einer der häufigsten Gründe für Blindheit in der westlichen Welt, entsteht durch den Verlust von Ganglienzellen (Quigley, 1996). Zahlreiche Studien zeigten die Fähigkeit von BDNF, Ganglienzellen vor dem Zelltod zu retten, wenn z.B. der Sehnerv entfernt wurde (Mey und Thanos, 1003; Zhang et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass BDNF das Überleben fördern kann, im embryonalen, sowie im adulten Stadium (Ma et al., 1998; Watanabe et al., 1997). Die starke Sensitivität von Ganglienzellen für BDNF wird durch das hohe Vorkommen des BDNF spezifischen Rezeptors TrkB, der ebenfalls stark in Amakrinzellen exprimiert wird, belegt (Cusato et al., 2002). Das bedeutet, dass vor allem die Zellen der inneren Retina hoch sensitiv für die durch BDNF ausgeübten neurotrophen Effekte sind.

In der vorliegenden Arbeit konnten Einflüsse auf die Zellen der inneren Retina vor allem durch den Nachweis der Amakrinzellen erbracht werden. Immunhistochemische Färbungen mit dem spezifischen Antikörper Pax6 gegen Zellen der inneren Retina, vor allem Amakrinzellen, erbrachten in den mit BDNF behandelten Kulturen wesentlich höhere Zellzahlen dieser Pax6-positiven Zellen. BDNF erhöht also signifikant die Determination und auch das Überleben von Amakrinzellen. Der

mehrfach gezeigte Effekt auf die Zellen der inneren Retina konnte auch für das Rosettensphäroidssystem nachgewiesen werden. Mehrfach konnte demonstriert werden, dass durch die Zugabe von BDNF zu Kulturen die Zellzahlen der INL erhöht werden kann, und auch die Dicke der plexiformen Schichten zunimmt (Pinzon-Duarte et al., 2004, Turner et al., 2006).

5.5.2 BDNF erhöht die Komplexität von Synapsen und ist wichtiger Differenzierungs- und Überlebensfaktor für cholinerge Neuronen der Retina

Verdickte plexiforme Schichten der Retina sprechen vor allem für eine höhere Komplexität von Synapsen. Neben den starken neurotrophen Effekten von BDNF, zeigt sich dieser Faktor ebenfalls als sehr potent bei der Ausbildung und Erhaltung von Plastizität und Organisation von Synapsen (Thoenen et al., 1995; Neal et al., 2003). Auch wird die synaptische Transmission von BDNF beeinflusst, z.B. vermag BDNF die Acetylcholinfreisetzung im synaptischen Spalt zu fördern. Um einen möglichen Einfluss der neurotrophen Faktoren auf das cholinerge System der Retina im Rosettensphäroidssystem näher zu betrachten, wurde mittels einer Karnosky-Root-Färbung die Aktivität des Acetylcholin-spaltenden Enzyms, AChE, nachgewiesen. Die Resultate zeigten deutliche Effekte nach der BDNF Behandlung. In den IPL-Bereichen wurden besonders intensive AChE-Aktivitäten nachgewiesen. Die IPL besteht aus den plexiformen Fasern der Zellen der INL. Das heißt, dass in den Bereichen der IPL die Synapsen gebildet werden. Eine erhöhte AChE-Aktivität weist demnach auf eine erhöhte Organisation und Plastizität von Synapsen hin. Es werden wesentlich mehr Synapsen gebildet, als in Kontrollkulturen oder nach der Behandlung mit GDNF. Zudem spricht die Erhöhung der AChE-Aktivität auch direkt für ein erhöhtes Vorkommen an cholinergen Neuronen. Sind mehr cholinerge Neuronen vorhanden, wird mehr Acetylcholin als Transmitter verwendet. Somit wird auch mehr Acetylcholin durch die AChE gespalten, wodurch eine höhere AChE-Aktivität benötigt wird. Die Resultate zeigen in diesem Zusammenhang BDNF als einen potenten Differenzierungs- und Überlebensfaktor für cholinerge Neuronen. Diese Erkenntnisse können durch zahlreiche Studien belegt werden, die BDNF ebenfalls hohes Potential zusprechen, cholinerge Neurone, im embryonalen Zustand in der Differenzierung zu fördern, und am Überleben zu erhalten (Hashimoto et al., 1999; Ward und Hagg, 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das

Auftreten der AChE im embryonalen Gewebe einer erhöhten Differenzierung zugesprochen werden kann (Layer et al., 1987).

Diese Erkenntnisse bestätigen das große Potential von BDNF als wertvolles Werkzeug bei der Therapie der Alzheimerschen Krankheit. Noch interessanter wäre in diesem Zusammenhang der Effekt von kombinierten Faktoren.

Kann z.B. durch die Kombination von GDNF und BDNF das Überlebenspotential für cholinerge Neuronen noch erhöht werden? In Hinblick auf die dopaminergen Neuronen konnten zahlreiche Ähnlichkeiten in Effekten zwischen GDNF und BDNF nachgewiesen werden. So sind dopaminerge Neurone ebenfalls sensitiv für BDNF als auch für GDNF; sie exprimieren stark den BDNF spezifischen Rezeptor TrkB (Lee et al., 2005). Diverse Studien zeigten, dass BDNF mit CNTF in Kombination einen achtfach erhöhten Effekt auf das Überleben von cholinergen Neuronen haben (Hashimoto et al., 1999). Vergleichbare Effekte konnten für das Überleben von Ganglienzellen gezeigt werden: Werden GDNF und BDNF in Kombination injiziert, kann das Überleben von Ganglienzellen wesentlich erhöht werden (Koeberle und Ball, 2002).

5.6 GDNF fördert das Überleben von Ganglienzellen

Ganglienzellen immunhistochemisch nachzuweisen erstellt sich insofern als problematisch, als dass es für das Rosettensphäroidsystem keinen eindeutig spezifischen Marker gibt. Jedoch kann man mittels des Markers ISLET-1 Zellen nachweisen, die voraussichtlich Ganglienzellen sind. Allerdings werden damit auch so genannte *displaced* Amakrinzellen und auch *displaced* Ganglienzellen angefärbt. Insofern bleibt es schwierig, eine klare Aussage über Zellzahlen und Entwicklung von Ganglienzellen im Rosettensphäroidsystem zu machen.

Der Gen-*Knock-down* von GDNF zeigte ganz dramatische Effekte genau für diese ISLET-1 positiven Zellen. In Vergleich zu Kontrollen waren die Zellzahlen der vermeintlichen Ganglien/*displaced* Amakrin und Ganglienzellen signifikant verringert. *Wie kann dieser dramatische Effekt erklärt werden?* Es gibt Hinweise, dass Kalzium-bindende Zellen der INL in die Zentren der IPL projizieren. Genau diese Zellen in den

Zentren der IPL-Bereiche sind Islet-1 positiv. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Zellen abhängig von neurotrophen Faktoren sind. Die Zugabe von exogenen GDNF oder auch BDNF zeigte keine signifikanten Effekte auf die Zellzahlen dieser Islet-1 positiven Zellen. Jedoch zeigte sich nach der Unterdrückung von GDNF eine dramatische Verringerung der Islet-1-positiven Zellen. Zu einem spricht das für die Effektivität von *loss-of-function*-Experimenten, um Einflüsse von z.B. neurotrophen Faktoren tiefer zu erforschen, als es mit der exogenen Zugabe alleine möglich wäre. Zum anderen weist es auf die Abhängigkeit von Ganglienzellen hin, insbesondere für GDNF. Diese Resultate werden mit zahlreichen Literaturdaten bestätigt: Nicht nur BDNF, sondern auch GDNF zeigte schon mehrfach die Fähigkeit, Ganglienzellen am Überleben zu erhalten (Koeberle und Ball, 2002; Yip und So, 2000).

5.7 Müllerzellen fungieren als Vermittlerstation zwischen neurotrophen Faktoren und Zielzellen

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, zeigen neurotrophen Faktoren wie GDNF, PEDF und BDNF differenzierte Effekte für separate retinale Zelltypen. GDNF fördert vor allem das Überleben und die Differenzierung von Stäbchen und von dopaminergen Amakrinzellen. PEDF zeigt sich prodifferenzierend auf Zapfen, aber inhibierend auf Müllerzellen und Stäbchen. BDNF ist essentiell für die Zellen der inneren Retina. Zu diesem Zeitpunkt stellt sich die Frage:

Wie werden diese unterschiedlichen Effekte für die einzelnen Zelltypen vermittelt? Für GDNF konnten mehrere Hinweise erbracht werden, dass dieser seine Überlebensfunktion auf Stäbchen direkt ausführt, während andere Faktoren diese Effekte indirekt ausüben. Für BDNF und PEDF wurden hinsichtlich der protektiven Eigenschaften für Photorezeptoren ebenfalls direkte Signalweiterleitungen gedacht. Hinweise auf eine direkte oder indirekte auf die Zielzelle ausgeübte Funktion, gibt die Expression der spezifischen Rezeptoren der jeweiligen Faktoren. Auf den Photorezeptoren konnten Rezeptoren identifiziert werden, die PEDF spezifisch binden (Behling et al., 2002). Diese Erkenntnisse sprechen für eine direkte Aktion von PEDF auf Photorezeptoren (Aymerich et al., 2001). Für CNTF konnten ebenfalls Rezeptoren auf den Photorezeptoren identifiziert werden. Eine mögliche Expression von TrkB, der spezifische Rezeptor für BDNF, ist bisher nur einmal in einer

Subpopulation von Zapfen nachgewiesen worden (DiPolo et al., 2000). Die Ähnlichkeiten zwischen PEDF und CNTF deuten auf eine direkte Signalweiterleitung für diese beiden Faktoren hin. BDNF wird jedoch allgemein keine direkte Signalausübung für Photorezeptoren zugesprochen. Für GDNF ist die Situation unklar: In der Maus und der Ratte konnte auf den Photorezeptoren der von GDNF bevorzugte Rezeptor GFR α 1 identifiziert werden (Koeberle und Ball, 2002). Im Huhn konnte eine starke Expression von GFR α 2 nachgewiesen werden, der von Neurturin bevorzugte Rezeptor, welcher aber auch an GDNF binden kann. (Karlsson et al., 2002). Ebenfalls im Huhn wurde eine intensive Expression von GFR α 4, dem bevorzugten Rezeptor von Persephin, in einer Subpopulation von Zapfen nachgewiesen (Volpert, 2002; Rothermel et al., 2004). Die Expression der Rezeptoren erweitert sich aber vor allem auf die Müllerzellen. Diese exprimieren nahezu alle Rezeptoren der GDNF-Familie, GFR α 1, 2 und 3 und auch die Signalweiterleitende Untereinheit cRET, in nahezu allen Spezies. Dieses Expressionsmuster würde für die GDNF-Familie eine indirekte Signalausübung bedeuten, in der die Müllerzellen als Vermittler eingeschaltet sind. Tatsächlich deuten jüngste Hinweise auf eben solch eine Effektausübung. Die Hinweise dafür verdichten sich, dass GDNF seine protektiven Eigenschaften indirekt über die Müllerzellen ausübt. Vor allem im Schwein trifft diese Annahme zu, seitdem in der Schweineretina keine GDNF-Rezeptoren auf den Photorezeptoren identifiziert wurden. Die neuroprotektive Funktionalität von GDNF wird indirekt über die Aktivierung von Müllerzellen vermittelt. Die Aktivierung der Müllerzellen durch GDNF führt wiederum zu einer Hochregulation von FGF-2, welches dann direkt auf die Photorezeptoren wirkt (Hauck et al., 2006). Diese Signalausübung setzt die Müllerzellen in den Mittelpunkt der von GDNF ausgeübten neuroprotektiven Aktionen.

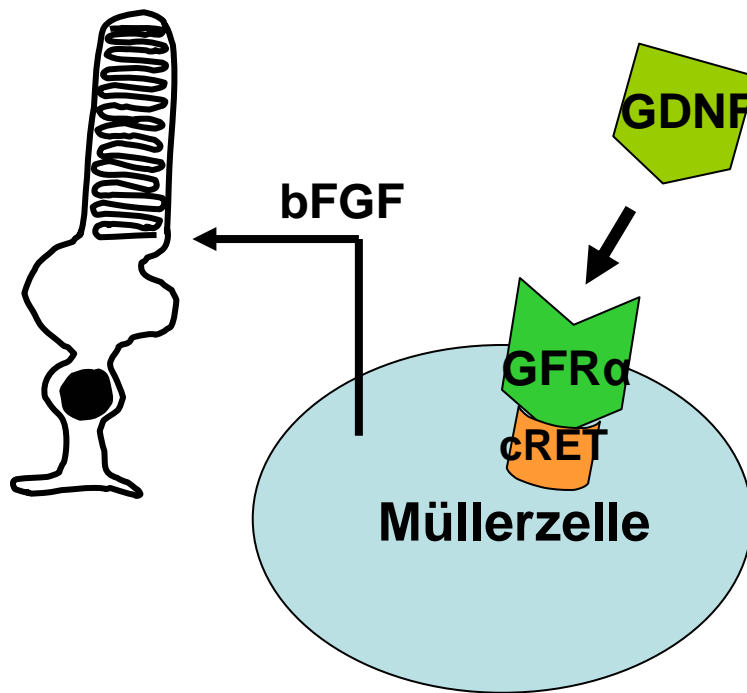


Abbildung 49. Indirekter Signalmechanismus von GDNF über die Aktivierung von Müllerzellen.

GDNF bindet an den Rezeptorkomplex aus GFRα und cRET. Die dadurch aktivierte Müllerzelle sekretiert bFGF, welches dann direkt auf die Photorezeptoren wirkt.

Die Expression der Rezeptoren ist, wie schon erwähnt, artspezifisch. Für den Rezeptor von CNTF gibt es unterschiedliche Verteilungsmuster: In Photorezeptoren bei adulten und entwickelnden Nagern konnten keine Rezeptoren nachgewiesen werden, jedoch aber in Photorezeptoren von anderen Säugetieren (Beltran et al., 2005). Das Rezeptorsystem für GDNF wird ebenfalls ganz unterschiedlich exprimiert. Da GFRα2 und auch GFRα4 auf den Photorezeptoren im Huhn identifiziert wurden, kann für das Huhn eine direkte Signalweiterleitung auf die Photorezeptoren nicht ausgeschlossen werden. Insofern kann zu diesem Zeitpunkt nicht genau geklärt werden, ob GDNF direkt oder indirekt seine neurotrophe Funktionen ausübt. Eine mögliche Kombination aus beiden Signalarten im Huhn ist wahrscheinlich.

Eine indirekte, über die Aktivierung der Müllerzellen ausgeführte, Signalweiterleitung konnte für zahlreiche neurotrophen Faktoren gezeigt werden, insbesondere wenn es um Effekte auf Photorezeptoren geht (Bringmann und Reichenbach, 2001; Harada 2003). Meist wird dann von den Müllerzellen ein Mitglied der FGF-Familie entlassen, welches dann direkt auf die Photorezeptoren wirkt. BDNF ist solch ein Beispiel: Seitdem bekannt ist, dass die Photorezeptoren keine TrkB

exprimieren, wird BDNF diese indirekte Aktion über die Aktivierung von Müllerzellen zugesprochen. Studien demonstrierten, dass ein von BDNF über Müllerzellen vermittelter Effekt die Degeneration von Photorezeptoren zu verlangsamen vermag (Gauthier et al., 2005). PEDF wird dabei eine gänzlich andere Funktion zugesprochen: Hinweise deuten darauf hin, dass PEDF ein Signal des Crosstalk zwischen Müllerzellen und Photorezeptoren darstellt (Wang et al., 2005).

Die Müllerzellen präsentieren sich als essentielle Schaltstation, um Signale von neurotrophen Faktoren, welche z.B. zum Überleben von unterschiedlichen Populationen von Photorezeptoren führen, weiterzuleiten. Damit rücken die Müllerzellen in den Mittelpunkt zahlreicher entwicklungsphysiologisch relevanter Prozesse während der Retinogenese.

5.8 Der Weg zu neuen Therapiemöglichkeiten liegt in der Kombination von Faktoren

Experimente mit unterschiedlichen Modellsystemen bewiesen, dass das Zusammenwirken von GDNF und CNTF den Tod von Photorezeptoren verzögern kann. Faktoren alleine zeigten oft keine signifikanten Effekte, jedoch das Zusammenwirken mehrerer scheint von großer Bedeutung.

Die molekularen Mechanismen, welche der Überlebensfunktionen zugrunde liegen, sind komplex und beinhalten Inhibition, Induktion der Synthese von sich selbst oder von anderen, in parakriner, autokriner Weise oder auch in inhibitorischen Rückkopplungsschleifen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Effekte zeigen für alle drei untersuchten neurotrophen Faktoren GDNF, PEDF und BDNF großes Potential während elementarer Entwicklungsprozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Alle Faktoren scheinen eine gewisse Spezialität zu besitzen: GDNF fungiert als Überlebensfaktor für Stäbchen und dopaminerge Neurone, und BDNF für Zellen der inneren Retina. Trotz ihres eigenen großen Potential konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Faktoren wesentlich größeres Potential in der Ausübung spezifischer Effekte hat, als jeder Faktor alleine. Das trifft vor allem für die Kombination GDNF und BDNF zu. Mit einer evtl. synergetischen Wirkung beider,

können die Überlebens-effekte für Photorezeptoren gesteigert werden. Diese Erkenntnisse werden durch unzählbare Beispiele der aktuellen Forschung bestätigt. GDNF und BDNF fördern das Überleben von Ganglienzellen in Kombination wesentlich mehr, als jeder für sich alleine (Koeberle und Ball, 2002). Ebenso haben GDNF und CNTF in Kombination größere Effekte auf das Überleben von Photorezeptoren (Ogilvie et al., 2000). Diese Erkenntnisse sprechen für die große Bedeutung des Zusammenwirkens mehrerer Faktoren (Erickson et al., 2001). Die genauen Mechanismen bleiben bis dahin noch weitestgehend ungeklärt, vor allem, welche Faktoren in welchen Zellsystemen und Spezies direkt, indirekt, synergetisch oder auch sequentiell agieren. Die aktuelle Forschung erhofft sich aber jetzt schon große Möglichkeiten bei der Behandlung zahlreicher degenerativer Krankheiten wie Retinitis Pigmentosa, Glaukom, der Parkinsonschen Krankheit und der Alzheimerschen Krankheit. Die Ansätze sind bisweilen zahlreich und gehen über die ersten Ansätze des Injizieren eines Faktors ins kranke Gewebe hinaus, um z.B. die Effekte zu verlängern (Steinberg 1994; Faktorovich et al., 1992; Cao et al., 2001). Viele Ansätze bedienen sich viraler Vektoren, mit denen sie das Gen für einen potenten Faktor in das jeweilige Gewebe einschleusen. Vor allem bei der Therapie zahlreicher Augenkrankheiten sieht man darin viel Hoffnung (Jomary et al., 1997; Liang et al., 2001; Martin et al., 2003). Es gibt auch erfolgreiche Modelle, die sich des Einsatzes von Stammzellen bedienen. Dabei werden Transplantate mit Stammzellen eingesetzt, die so manipuliert sind, dass sie über einen längeren Zeitraum konstante Mengen von z.B. GDNF entlassen (Akerud et al., 2001).

Mehrere Aspekte müssen bei allen Hoffungen jedoch berücksichtigt werden: Zum einem gibt es noch keine erfolgreichen therapeutischen Modelle, die eine wirklich dauerhafte Zugabe von Faktoren erlauben. Zum anderen können Faktoren den Tod von Zellen für eine gewisse Dauer aufhalten, jedoch nicht vollständig verhindern. Zudem ist nicht der Effekt eines Faktors alleine essentiell, sondern hängt von der Kombination mehrerer Faktoren und anderer Signale aus der Umgebung ab. Damit ist eine Komplexität erreicht, die noch lange nicht verstanden ist.

5.9 Resümee und Ausblick

Wie die vorliegende Arbeit bestätigt, repräsentiert das Rosettensphäroidsystem ein erfolgreiches Modell zur Manipulation und zur Erforschung der Entwicklungsprozesse in der Retina. In der vorliegenden Arbeit konnten neben den allgemeinen Einflüssen auf Apoptose und Proliferation, diverse Effekte der einzelnen neurotrophen Faktoren für die unterschiedlichen retinalen Zelltypen detailliert aufgeklärt werden. Die Resultate der vorliegenden Arbeit offenbaren für GDNF das weiträumigste Potential während der Retinogenese *in vitro*. GDNF beeinflusst die Erhaltung von Photorezeptoren (Stäbchen), Amakrinzellen (dopaminerg), Müllerzellen und Ganglienzellen. Demzufolge fördert GDNF Zellen aller drei nukleären Zellschichten der Retina, die ONL, INL und GCL. BDNF zeigte sein größtes Potential für die Zellen der inneren Retina. Amakrinzellen, vor allem die cholinergen, werden durch den Einfluss von BDNF stimuliert. PEDF beeinflusst ebenso wie GDNF die Photorezeptoren, aber mit gegensätzlicher Auswirkung: Stäbchen werden inhibiert und Zapfen stimuliert. Einen ebenso inhibierenden Einfluss von PEDF konnte für die Müllerzellen nachgewiesen werden.

	PHOTOREZEPTOREN		ZELLEN DER INNEREN RETINA		
	Stäbchen	Zapfen	Amakrinzellen	Müllerzellen	Ganglienzellen
GDNF	stimulierend	kein signifikanter Einfluss	(dopaminerg) stimulierend	stimulierend	stimulierend
PEDF	inhibierend	stimulierend	inhibierend	inhibierend	?
BDNF	kein signifikanter Einfluss	kein signifikanter Einfluss	(cholinerg) stimulierend	?	stimulierend (nicht gezeigt)

Tabelle 7. Die Effekte von GDNF, PEDF und BDNF für die Retinogenese *in vitro*. Diese Angaben beziehen sich auf die Effekte jedes Faktors für sich alleine.

Die Vorteile des Rosettensphäroidsystems liegen auf der Hand: Die Kulturen können leicht von außen manipuliert werden. z.B. durch die exogene Zugabe eines

Faktors, oder durch Manipulation auf der Genexpressionsebene. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen aber auch die Vorteile von so genannten *loss-of-function*-Experimenten gegenüber *gain-of-function*-Experimenten. Bei *gain-of-function*-Experimenten wird exogen ein Faktor in das Medium dazugegeben. Da aber durch das im Medium enthaltene Serum ebenfalls Faktoren zugegen sind, ist man über die genaue Konzentration des zu analysierenden Faktors im Unklaren. Die Gefahr besteht, dass man sich z.B. im Sättigungsbereich eines bestimmten Faktors befindet. In dieser Arbeit wurde lediglich 2% Serum zur Kultivierung eingesetzt, um möglichst alle äußeren Einfluss kontrollieren zu können. Optimaler wäre der Einsatz eines serumfreien Mediums. Jedoch erweist sich die Kultivierung von Rosettensphäroiden in serumfreiem Medium als nahezu unmöglich, so dass die Zugabe von wenigstens 2% Serum überlebenswichtig für die Kulturen ist. Die Vorteile der *loss-of-function*-Experimente werden deutlich: Ein Gen zu unterdrücken, kann demnach einen tieferen Einblick in mögliche Effekte geben, als es mit der exogenen Zugabe von Faktoren möglich wäre.

In folgenden Untersuchungen sollten somit *loss-of-function*-Experimente eingesetzt werden, um die gezeigten Effekte von PEDF und BDNF zu bestätigen und zu ergänzen. Des Weiteren sollte vor allem ein Schwerpunkt in die Erforschung der kombinierten Effekte von mehreren neurotrophen Faktoren für die Retinogenese *in vitro* gesetzt werden. Die Wirkung von neurotrophen Faktoren in ihrer Gesamtheit ist äußerst komplex. Diese Komplexität, welche vor allem in den Kombinationseffekten von einzelnen Faktoren zum Ausdruck kommt, bedarf noch weiterer zellhistologischer und molekularbiologischer Untersuchungen.

Bei allen Vor- und Nachteilen des verwendeten Kultursystems ist jedoch immer zu bedenken, dass jedes Kultursystem die *in vivo*-Situation nur ansatzweise wider spiegeln kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Studien der vorliegenden Arbeit sollten zur Aufklärung von neurotrophen Einflüssen, ausgelöst durch die Zytokine GDNF, PEDF und BDNF, während der Retinogenese *in vitro* beitragen. Als Modellsystem dienten Kulturen embryonaler retinaler Hühnerzellen, die als histotypische dreidimensionale Reaggregate, so genannte Rosettensphäroide, eingesetzt wurden. Die Analyse möglicher Effekte von GDNF, PEDF und BDNF während elementarer Entwicklungsprozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose von unterschiedlichen retinalen Zelltypen sollte mittels immunhistochemischer Untersuchungen, sowie mit Untersuchungen auf der Genexpressionsebene erfolgen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden so genannte *gain-of-function*-Experimente durchgeführt, in denen die auch als neurotrophen Faktoren bezeichneten Zytokine GDNF, PEDF und BDNF in diversen Konzentrationen zu den Kulturen gegeben wurden. In einem zweiten Teil sollten die neu gewonnenen Erkenntnisse vertieft werden, insbesondere die Rolle von GDNF während der Retinogenese. Dafür wurden so genannte *loss-of-function*-Experimente angewendet, in denen das Gen für GDNF mittels einer Antisense-Strategie erfolgreich herunterreguliert wurde. Die Resultate beider experimenteller Teile führten zu folgenden Erkenntnissen:

Die Applikation von exogenen GDNF, PEDF bzw. BDNF, resultierte in einer gesteigerten Proliferationsrate der retinalen Zellen, welche sich vor allem zu früheren Kultivierungszeitpunkten ausdrückte. Eine weitere Folge der Behandlung mit den erwähnten neurotrophen Faktoren, ergab sich in einer bemerkenswerten Abnahme apoptotischer Zellen. In der Gegenwart von GDNF, PEDF bzw. BDNF waren weitaus weniger Zellen dem programmierten Zelltod erlegen, als vergleichsweise Zellen in Kontrollkulturen.

Nachdem die Analyse dieser elementaren Entwicklungsvorgänge einen eher einheitlichen Einfluss der untersuchten Faktoren offenbarte, sollten des Weiteren mögliche Effekte des neurotrophen Einflusses für diverse Zelltypen der Retina untersucht werden. Bei der Aufklärung der charakteristischen Rosettensphäroidstruktur, mittels des Nachweises der Müllerzellen, eröffneten sich erste Unterschiede in der neurotrophen Wirksamkeit von GDNF und PEDF: Während GDNF die Strukturbildung der Kulturen für längere Zeit aufrechterhalten konnte, zeigte die Zugabe von exogenen PEDF dramatische Auswirkungen auf die Ausbildung der Müllerzellen, und somit auf eine geordnete Sphäroidsstruktur. Erst im Einsatz in der

Kombination mit GDNF konnten diese störenden Einflüsse von PEDF aufgehoben werden. Allgemein muss den Müllerzellen die Rolle des Vermittlers zwischen Zielzellen und neurotrophen Faktoren zugesprochen werden.

Ähnliche gegensätzliche Wirkungen von GDNF und PEDF konnten für die Entwicklung der Photorezeptoren aufgezeigt werden: Während GDNF die Determination und das Überleben von Stäbchen signifikant stimulierte, zeigte PEDF auf immunhistochemischer, als auch auf der Genexpressionsebene, einen inhibierenden Einfluss auf Stäbchen. Im Gegenzug wurden durch die Zugabe von exogenen PEDF vermehrt Zapfen differenziert, was insbesondere durch die erhöhte Expression der Zapfen-Opsine verdeutlicht wurde. PEDF präsentierte sich im Rosettensphäroidsystem als ein wirkungsvoller prodifferenzierender Faktor für Zapfen. Die Kombination von GDNF und PEDF offenbarte indes für PEDF zu früheren Entwicklungszeitpunkten seinen größten Einfluss auf Photorezeptoren. Zu späteren Zeitpunkten erwiesen sich die Photorezeptoren erhöht sensitiv für GDNF. BDNF zeigte sich nur in der Kombination mit GDNF einflussreich auf die Entwicklung der Stäbchen und Zapfen. Der zusätzliche Einsatz von BDNF potenzierte die Effekte von GDNF.

Die Zellen der inneren Retina offenbarten einen anderen Bedarf an neurotrophen Faktoren. Insbesondere BDNF erwies sich als potenter Determinierungsfaktor für Amakrinzellen. Eine Subpopulation von Amakrinzellen zeigte sich höchst sensitiv für BDNF. Die histochemische Analyse der AChE-Aktivität detektierte, dass cholinerge Amakrinzellen in der INL in Gegenwart von BDNF vermehrt differenziert wurden. Überdies hinaus präsentierte sich BDNF als Stimulator für eine erhöhte Plastizität der Synapsen in der IPL. Eine weitere Subpopulation der Amakrinzellen, die dopaminergen Neurone der Retina, zeigte hohe Sensitivität für GDNF. Die Zugabe von exogenen GDNF resultierte in einer verfrühten Differenzierung der dopaminergen Amakrinzellen, zudem wurden diese durch GDNF länger am Überleben gehalten. Eindrucksvoll bestätigt wurde dieser Effekt durch den Gen-*Knock-down* von GDNF. Es konnte gezeigt werden, dass jegliche Expression des Enzyms Tyrosinhydroxylase, welches als Marker für dopaminerge Amakrinzellen angesehen werden kann, unterdrückt wird.

Die Zellen der dritten retinalen Schicht, die Ganglienzellen, erwiesen sich ebenfalls beeinflusst durch GDNF. Der Gen-*Knock-down* von GDNF resultierte in einer verminderten Determination von Ganglienzellen.

Zusammenfassend präsentierte sich GDNF mit dem weiträumigsten Wirkungsspektrum: GDNF beeinflusste die Entwicklung von Zellen aller drei retinaler Schichten, der ONL, der INL und der GCL. PEDF zeigte seinen größten Einflüsse auf die Zellen der ONL, insbesondere auf Zapfen. BDNF erwies sich als entscheidender Faktor für Zellen der inneren Retina.

Abschließend bleibt zu bemerken, auch wenn jeder Faktor für sich alleine entwicklungsphysiologisches Potential bewies, dass die kombinierten Effekte von GDNF, BDNF und PEDF in einem erhöhten einflussreichen Potential resultierten. Die Müllerzellen rücken in das Zentrum entwicklungsbiologischer Prozesse, vermittelt durch diverse neurotrophe Faktoren. Die Aufklärung der Komplexität der Wirkungsweise zwischen neurotrophen Faktoren, Faktoren aus der zellulären Umgebung, und Müllerzellen während der Retinogenese, sollte Forschungsbestand weiterer Untersuchungen sein.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adler R, Tamres A, Bradford RL, Belecky-Adams TL (2001).** Microenvironmental regulation of visual pigment expression in the chick retina. *Dev Biol.* 236:454-464.
- Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M (1999).** GDNF family neurotrophic factor signalling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci.* 13:313-325.
- Alberdi E, Aymerich MS, Becerra SP (1999).** Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem.* 274:31605-612.
- Altshuler D, Cepko CL (1992).** A temporally regulated, diffusible activity is required for rod photoreceptor development in vitro. *Development.* 114:947-957.
- Akerud P, Canals JM, Snyder EY, Arenas E (2001).** Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 21:8108-8118.
- Apte RS, Barreiro RA, Duh E, Volpert O, Ferguson TA (2004).** Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic factor PEDF. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:4491-4497.
- Araki T, Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP (1998).** Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death. *J Neurosci Res.* 53:7-15.
- Araki M, Maeda T, Kimura H (1983).** Dopaminergic cell differentiation in developing chick retina. *Brain Res Bul.* 11:97-102.
- Armstrong PB (1989).** Cell sorting out: the self-assembly of tissues in vitro. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 24:119-149.
- Aymerich MS, Alberdi EM, Martinez A, Becerra SP (2001).** Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:3287-3293.
- Azadi S, Johnson LE, Paquet-Durand F, Perez MT, Zhang Y, Ekstrom PA, van Veen T (2007).** CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain Res.* 1129:116-129.
- Bakshi A, Shimizu S, Keck CA, Cho S, LeBold DG, Morales D, Arenas E, Snider EY, Watson DJ, McIntosh TK (2006).** Neural progenitor cells engineered to secrete GDNF show enhanced survival, neuronal differentiation and improve cognitive function following traumatic brain injury. *Eur J Neurosci.* 23:2119-2134.
- Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Milbrandt J (2000).** The GDNF family ligands and receptors: implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol.* 10:103-110.
- Baranyay F, Bogar G, Sebestyen M (2000).** Adult Hirschsprung's disease with mental retardation and microcephaly. *Orv Hetil.* 141:1673-1676.
- Barbacid M (1994).** The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 25:1386-1403.
- Becerra SP, Palmer I, Kumar A, Steele F, Shiloach J, Notario V, Chader GJ (1993).** Overexpression of fetal human pigment epithelium-derived factor in *Escherichia coli*. A functionally active neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 268:23148-23156.

- Becker E, Soler RM, Yuste VJ, Gine E, Sanz-Rodriguez C, Egea J, Martin-Zanca D, Comella JX (1998).** Development of survival responsiveness to brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neurotrophin 4/5, but not to nerve growth factor, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord. *J Neurosci.* 18:7903-7911.
- Behling KC, Surace EM, Bennett J (2002).** Pigment epithelium-derived factor expression in the developing mouse eye. *Mol Vis.* 8:449-454.
- Ben-Shaul Y, Moscona AA (1975).** Scanning electron microscopy of embryonic neural retina cell surfaces. *Dev Biol.* 44:386-393.
- Besset V, Scott RP, Ibanez CF (2000).** Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 275:39159-39166.
- Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, Lehar M, Tombran-Tink J, Kuncel RW (1999).** Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58:719-728.
- Bringmann A, Reichenbach A (2001).** Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* 6:E72-92.
- Bohn MC (2000).** Parkinson's disease: a neurodegenerative disease particularly amenable to gene therapy. *Mol Ther.* 1:494-496.
- Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, Corset V, Bidaud C, Billaud M, Bredesen DE, Edery P, Mehlen P (2000).** The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J.* 19:4056-4063.
- Buchman VL, Davies AM (1993).** Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival of embryonic sensory neurons. *Development.* 118:989-1001.
- Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, Rosenthal A, Davies AM (1995).** GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron.* 15:821-828.
- Campochiaro PA, Sugg R, Grotendorst G, Hjelmeland LM (1989).** Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media. *Exp Eye Res.* 49:217-227.
- Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, McGinnis JF (1999).** Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res.* 57:789-800.
- Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF (2001).** In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:1646-1652.
- Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillips DR (1985).** Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem.* 260:1743-1749.
- Carwile ME, Culbert RB, Sturdivant RL, Kraft TW (1998).** Rod outer segment is enhanced in the presence of bFGF, CNTF and GDNF. *Exp Eye Res.* 66:791-805.
- Cayouette M, Gravel C (1997).** Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Human Gene Therapy.* 8:423-430.
- Cayouette M, Smith SB, Becerra SP, Gravel C (1999).** Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. *Neurobiol Dis.* 6:523-532.

- Cellerino A, Kohler K (1997).** Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor trkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina. *J Comp Neurol.* 386:149-160.
- Cellerino A, Pinzon-Duarte G, Carroll P, Kohler K (1998).** Brain-derived neurotrophic factor modulates the development of the dopaminergic network in the rodent retina. *J Neurosci.* 18:3351-362.
- Cepko CL (1996).** The patterning and onset of opsin expression in vertebrate retinæ. *Curr Opin Neurobiol.* 6:542-546.
- Chader GJ (2001).** PEDF: Raising both hopes and questions in controlling angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:2122-2124.
- Chun MH, Ju WK, Kim KY, Lee MY, Hofmann HD, Kirsch M, Oh SJ (2000).** Upregulation of ciliary neurotrophic factor in reactive Muller cells in the rat retina following optic nerve transection. *Brain Res.* 868:358-362.
- Connor TB Jr, Roberts AB, Sporn MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG, de Bustros S, Enger C, Kato H, Lansing M, et al (1989).** Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *J Clin Invest.* 183:1661-1666.
- Cusato K, Bosco A, Linden R, Reese BE (2002).** Cell death in the inner nuclear layer of the retina is modulated by BDNF. *Brain Res Dev Brain Res.* 139:325-330.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP (1999).** Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science.* 285:245-248.
- DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, Bazan NG (1999).** Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 56:604-610.
- Delyfer MN, Simonutti M, Neveux N, Léveillard T, Sahel JA (2005).** Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST? *Mol Vis.* 11:677-687.
- Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ (2000).** Colocalization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green-red-sensitive cone outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:4014-21.
- Dos Santos RM, Gardino PF (1998).** Differential distribution of a second type of tyrosine hydroxylase immunoreactive amacrine cell in the chick retina. *J Neurocytol.* 27:33-43.
- Ehninger B (1982).** Neurotransmitter system in the retina. *Retina* 2:305-321
- Eichler W, Yafai Y, Keller T, Wiedemann P, Reichenbach A (2004).** PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res.* 299:68-78.
- Ek ET, Dass CR, Choong PF (2006).** Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 5:1641-1646.
- Ek ET, Dass CR, Choong PF (2006).** PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med.* 12:497-502.
- Enomoto H, Heuckeroth RO, Golden JP, Johnson EM, Milbrandt J (2000).** Development of cranial parasympathetic ganglia requires sequential actions of GDNF and neurturin. *Development.* 127:4877-4889.
- Erickson JT, Brosenitsch TA, Katz DM (2001).** Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J Neurosci.* 21:581-589.

- Ezzeddine ZD, Yang X, DeChiara T, Yancopoulos G, Cepko CL (1997).** Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. *Development*. 124:1055-1067.
- Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1990).** Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature*. 347:83-86.
- Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1992).** Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci*. 12:3554-3567.
- Fassio JB, Brockman EB, Jumblatt M, Greated C, Henry JL, Geoghegan TE, Barr C, Schultz GS (1989).** Transforming growth factor alpha and its receptor in neural retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 30:1916-1922.
- Fernandez-Garcia NI, Volpert OV, Jimenez B (2007).** Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. *J Mol Med*. 85:15-22.
- Fischer AJ, Reh TA (2001).** Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci*. 4:247-252.
- Frade JM, Marti E, Bovolenta P, Rodriguez-Pena MA, Perez-Garcia D, Rohrer H, Edgar D, Rodriguez-Tebar A (1996).** Insulin-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the alpha 6 integrin subunit. *Development*. 122:2497-2506.
- Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA (1996).** Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*. 383:166-168.
- Frasson M, Picaud S, Léveillard T, Simonutti M, Mohand-Said S, Dreyfus H, Hicks D, Sabel J (1999).** Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the *rd/rd* mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40:2724-2734.
- Frittsch B, Farinas I, Reichardt LF (1997).** Lack of neurotrophin 3 causes losses of both classes of spiral ganglion neurons in the cochlea in a region-specific fashion. *J Neurosci*. 17:6213-6225.
- Fuhrmann S, Kirsch M, Hofmann HD (1995).** Ciliary neurotrophic factor promotes chick photoreceptors development in vitro. *Development*. 121:2695-2706.
- Gardino PF, dos Santos RM, Hokoc JN (1993).** Histogenesis and topographical distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactive amacrine cells in the developing chick retina. *Brain Res Dev Brain Res*. 72:226-236.
- Garner AS, Menegay HJ, Boeshore KL, Xie XY, Voci JM, Johnson JE, Large TH (1996).** Expression of TrkB receptor isoforms in the developing avian visual system. *J Neurosci*. 16:1740-1752.
- Gaur VP, Liu Y, Turner JE (1992).** RPE conditioned medium stimulates photoreceptor cell survival, neurite outgrowth and differentiation in vitro. *Exp Eye Res*. 54:645-659.
- Gauthier R, Joly S, Pernet V, Lachapelle P, Di Polo A (2005).** Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to muller glia preserves structure and function of light-damaged photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46:3383-3392.
- Germer A, Jahnke C, Mack A, Enzmann V, Reichenbach A (1997).** Modification of glutamine synthetase expression by mammalian Muller (glial) cells in retinal organ cultures. *Neuroreport*. 8:3067-3072.
- Gilbert SF (2000).** Developmental Biology. 6th Edition, Sinauer Associates

- Gramer E, Tausch M, Kraemer C (1996-1997).** Time of diagnosis, reoperations and long-term results of goniotomy in the treatment of primary congenital glaucoma: a clinical study. *Int Ophthalmol.* 20:117-123.
- Granhölm AC, Reyland M, Albeck D, Sanders L, Gerhardt G, Hoernig G, Shen L, Westphal H, Hoffer B (2000).** Glial cell line-derived neurotrophic factor is essential for postnatal survival of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci.* 20:3182-3190.
- Golden JG, DeMaro JA, Osborne PA, Milbrandt J, Johnson EM (1999).** Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp Neurol.* 158:504-528.
- Goureau O, Rhee KD, Yang XJ (2004).** Ciliary neurotrophic factor promotes muller glia differentiation from the postnatal retinal progenitor pool. *Dev Neurosci.* 26:359-370.
- Hallböök F, Backström A, Kullander K, Ebendal T, Carri NG (1996).** Expression of neurotrophins and trk receptors in the avian retina. *J Comp Neurol.* 364:664-676.
- Harada C, Harada T, Quah HM, Maekawa F, Yoshida K, Ohno S, Wada K, Parada LF, Tanaka K (2003).** Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience.* 122:229-235.
- Hashimoto Y, Abiru Y, Nishio C, Hatanaka H (1999).** Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor on cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal 2-week-old rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 115:25-32.
- Hashino E, Johnson EM Jr, Milbrandt J, Shero M, Salvi RJ, Cohan CS (1999).** Multiple actions of neurturin correlate with spatiotemporal patterns of Ret expression in developing chick cranial ganglion neurons. *J Neurosci.* 19:8476-8486.
- Hauck SM, Kinkl N, Deeg CA, Swiatek-de Lange M, Schöffmann S, Ueffing M (2006).** GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. *Mol Cell Biol.* 26:2746-2757.
- Hearn CJ, Murphy M, Newgreen D (1998).** GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Dev Biol.* 197:93-105.
- Heuckeroth RO, Lampe PA, Johnson EM, Milbrandt J (1998).** Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev Biol.* 200:116-129.
- Hewitt AT, Lindsey JD, Carbott D, Adler R (1990).** Photoreceptor survival-promoting activity in interphotoreceptor matrix preparations: characterization and partial purification. *Exp Eye Res.* 50:79-88.
- Hicks D, Courtois Y (1992).** Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation in vitro. *J Neurosci.* 12:2022-2033.
- Hollyfield JG, Witkovsky P (1974).** Pigmented retinal epithelium involvement in photoreceptor development and function. *J Exp Zool.* 189:357-378.
- Holt CE, Bertsch TW, Ellis HM, Harris WA (1988).** Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron.* 1:15-26.
- Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, Rosenblad C, Kirik D, Moffat B, Simmons L, Johnson E, Milbrandt J, Rosenthal A, Bjorklund A, Vandlen RA, Hynes MA, Phillips HS (1998).** Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 18:4929-4937.
- Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip NY, Lindsay RM (1994).** Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J Neurosci.* 14:335-347.

- Ibanez C (1998).** Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 21:438-44
- Imai D, Yoneya S, Gehlbach PL, Wei LL, Mori K (2005).** Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death. *J Cell Physiol.* 202:570-578.
- Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A (2000).** Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J Neurosci.* 20:7149-7157.
- Jablonski MM, Iannaccone A (2001).** Lactose supports Muller cell protein expression patterns in the absence of the retinal pigment epithelium. *Mol Vis.* 7:27-35.
- Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A (2001).** Pigment epithelium-derived factor supports normal Muller cell development and glutamine synthetase expression after removal of the retinal pigment epithelium. *Glia.* 35:14-25.
- Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW, Fox GM (1996).** GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell.* 85:1113-1124.
- Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H (1986).** Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 6:3031-3038.
- Jomary C, Vincent KA, Grist J, Neal MJ, Jones SE (1997).** Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene Ther.* 4:683-690.
- Jomary C, Darrow RM, Wong P, Organisciak DT, Jones SE (2004).** Expression of neurturin, glial cell line-derived neurotrophic factor, and their receptor components in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:1240-1246.
- Ju WK, Lee MY, Hofmann HD, Kirsch M, Chun MH (1999).** Expression of CNTF in Muller cells of the rat retina after pressure-induced ischemia. *Neuroreport.* 10:419-422.
- Kagami H, Sakai H, Uryu K, Kaneda T, Sakanaka M (1991).** Development of tyrosine hydroxylase-like Immunoreactive structures in the chick retina: three-dimensional analysis. *J Comp Neurol.* 308:356-370.
- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A (1999).** Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature.* 401:918-921.
- Kandel ER, Schwartz JH, Kessel TM (1991).** Principles of Neuronal Science. Norwalk, Appelton & Lange
- Kaplan DR, Miller FD (2000).** Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 10:381-391.
- Karlsson M, Lindqvist N, Mayordomo R, Hallböök F (2002).** Overlapping and specific patterns of GDNF, c-ret and GFRα mRNA expression in the developing chicken retina. *Mech. Dev.* 114:161-165.
- Karnovsky MJ, Roots L (1964).** A "direct-colouring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem.* 12:219-221
- Kawata A, Oishi T, Fukada Y, Shichida Y, Yoshizawa T (1992).** Photoreceptor cell types in the retina of various vertebrate species: immunocytochemistry with antibodies against rhodopsin and iodopsin. *Photochem Photobiol.* 56:1157-1166.

- Kido N, Tanihara H, Honjo M, Inatani M, Tatsuno T, Nakayama C, Honda Y (2000).** Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Res.* 884:59-67.
- Kirsch M, Lee MY, Meyer V, Wiese A, Hofmann HD (1997).** Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. *J Neurochem.* 68:979-990.
- Klocker N, Braunling F, Isenmann S, Bahr M (1997).** In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells. *Neuroreport.* 8:3439-3442.
- Koeberle PD, Ball AK (1998).** Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy. *Vision Res.* 38:1505-1515.
- Koeberle PD, Ball AK (2002).** Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience.* 110:555-567.
- Kriegler MP (1990).** DAN transfer, in Gene Transfer and Expression: A Laboratory manual. *Stockton Press, New York.* 5:96-98
- Kriegstein K, Farkas L, Unsicker K (1998).** TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins. *J Neurobiol.* 37:563-572.
- Lapchak PA, Gash DM, Collins F, Hilt D, Miller PJ, Araujo DM (1997).** Pharmacological activities of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF): preclinical development and application to the treatment of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 145:309-321.
- LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH (1992).** Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:11249-11253.
- Layer PG (1983).** Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chicken brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:6413-6417.
- Layer PG, Sporns O (1987).** Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:284-288.
- Layer PG, Alber R, Sporns O (1987).** Quantitative development and molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase during morphogenesis and synaptogenesis of chick brain and retina. *J Neurochem.* 49:175-182.
- Layer PG, Willbold E (1989).** Embryonic chicken retinal cells can regenerate all cell layers in vitro, but ciliary pigmented cells induce their correct polarity. *Cell Tissue Res.* 258:233-242.
- Layer PG, Willbold E (1993).** Histogenesis of the avian retina in reaggregation culture: from dissociated cells to laminar neuronal networks. *Int Rev Cytol.* 146:1-47.
- Layer PG, Willbold E (1994).** Cholinesterases in avian neurogenesis. *Int Rev Cytol.* 151:139-181.
- Layer PG, Willbold E (1995).** Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Prog Histochem Cytochem.* 29:1-94.
- Layer PG, Rothermel A, Hering H, Wolf B, deGrip WJ, Hicks D, Willbold E (1997).** Pigmented epithelium sustains cell proliferation and decreases expression of opsin and acetylcholinesterase in reaggregated chicken retinospheroids. *Eur J Neurosci.* 9:1795-1803.
- Layer PG, Robitzki AA, Rothermel A, Willbold E (2002).** Of layers and spheres: the aggregate approach in tissue engineering. *Trends Neurosci.* 25:131-134.

- Lee EJ, Song MC, Kim HJ, Lim EJ, Kim IB, Oh SJ, Moon JI, Chun MH (2005).** Brain-derived neurotrophic factor modulates the dopaminergic network in the rat retina after axotomy. *Cell Tissue Res.* 322:191-199.
- Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR (1995).** Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8074-8077.
- Levine EM, Roelink H, Turner J, Reh TA (1997).** Sonic hedgehog promotes rod photoreceptor differentiation in mammalian retinal cells in vitro. *J Neurosci.* 17:6277-6288.
- Levine EM, Fuhrmann S, Reh TA (2000).** Soluble factors and the development of rod photoreceptors. *Cell Mol Life Sci.* 57:224-234.
- Lewis H, Schachat AP, Haimann MH, Haller JA, Quinlan P, von Fricken MA, Fine SL, Murphy RP (1990).** Choroidal neovascularization after laser photocoagulation for diabetic macularedema. *Ophthalmology.* 97:503-510.
- Lewis GP, Linberg KA, Geller SF, Guerin CJ, Fisher SK (1999).** Effects of the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:1530-1544.
- Li H, Tran VV, Hu Y, Mark Saltzman W, Barnstable CJ, Tombran-Tink J (2006).** A PEDF N-terminal peptide protects the retina from ischemic injury when delivered in PLGA nanospheres. *Exp Eye Res.* 83:824-833.
- Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, Dudus L, Fisher KJ, Maguire AM, Jacobson SG, Bennett J (2001).** Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther.* 4:461-472.
- Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA, Penn State Retina Research Group (2000).** Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin Exp Ophthalmol.* 28:1-2.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993).** GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 21:1130-1132.
- Lohof AM, Ip NY, Poo MM (1993).** Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature.* 363:350-353.
- Lorentz O, Sahel J, Mohand-Said S, Leveillard T (2006).** Cone survival: identification of RdCVF. *Adv Exp Med Biol.* 572:315-319.
- Luft WA, Iuvone PM, Stell WK (2004).** Spatial, temporal, and intensive determinants of dopamine release in the chick retina. *Vis Neurosci.* 21:627-635.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994).** Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1632-1636.
- Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein RL, Hauswirth WW (2003).** Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:4357-4365.
- Mariani AP, Hokoc JN (1988).** Two types of tyrosine hydroxylase-immunoreactive amacrine cell in the rhesus monkey retina. *J Comp Neurol.* 276:81-91.
- Massoulie J, Bon S (1982).** The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosci.* 5:57-106.
- McGee Sanftner LH, Abel H, Hauswirth WW, Flannery JG (2001).** Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther.* 4:622-629.

- McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG (1988).** Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol.* 24:574-576.
- Mey J, Thanos S (1992).** Development of the visual system of the chick--a review. *J Hirnforsch.* 33:673-702.
- Mey J, Thanos S (1999).** Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res.* 1993 Feb 5;602(2):304-17.
- McAllister AK. Subplate neurons: a missing link among neurotrophins, activity, and ocular dominance plasticity? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13600-13602.
- Molliver DC, Snider WD (1997).** Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol.* 381:428-438.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964).** Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem.* 239:2910-2917.
- Neal M, Cunningham J, Lever I, Pezet S, Malcangio M (2003).** Mechanism by which brain-derived neurotrophic factor increases dopamine release from the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:791-798.
- Northington FK, Hamill RW, Banerjee SP (1985).** Dopamine stimulated adenylate cyclase and tyrosine hydroxylase in diabetic rat retina. *Brain Res.* 337:151-154.
- Nosrat CA, Tomac A, Lindqvist E, Lindskog S, Humpel C, Stromberg I, Ebendal T, Hoffer BJ, Olson L (1996).** Cellular expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system. *Cell Tissue Res.* 286:191-207.
- Ogata N, Wada M, Otsuji T, Jo N, Tombran-Tink J, Matsumura M (2002).** Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:1168-1175.
- Ogilvie JM, Speck JD, Lett JM (2000).** Growth factors in combination, but not individually, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture. *Exp Neurol.* 161:676-685.
- Okoye G, Zimmer J, Sung J, Gehlbach P, Deering T, Nambu H, Hackett S, Melia M, Esumi N, Zack DJ, Campochiaro PA (2003).** Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. *J Neurosci.* 23:4164-4172.
- Ortego J, Escribano J, Crabb J, Coca-Prados M (1996).** Identification of a neuropeptide and neuropeptide-processing enzymes in aqueous humor confers neuroendocrine features to the human ocular ciliary epithelium. *J Neurochem.* 66:787-796.
- Oyster CW, Takahashi ES, Cilluffo M, Brecha NC (1985).** Morphology and distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the cat retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:6335-6339.
- Peterson WM, Wang Q, Tzekova R, Wiegand SJ (2000).** Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. *J Neurosci.* 20:4081-4090.
- Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE (1995).** Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:905-909.
- Pinzon-Duarte G, Arango-Gonzalez B, Guenther E, Kohler K (2004).** Effects of brain-derived neurotrophic factor on cell survival, differentiation and patterning of neuronal connections and Muller glia cells in the developing retina. *Eur J Neurosci.* 19:1475-1484.
- Pittack C, Grunwald GB, Reh TA (1997).** Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development.* 124:805-816.

- Plouet J, Gospodarowicz D (1989).** Transforming growth factor beta-1 positively modulates the bioactivity of fibroblast growth factor on corneal endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1989;141:392-399.
- Politi LE, Rotstein NP, Carri NG (2001).** Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:3008-3015.
- Prada C, Puga J, Perez-Mendez L, Loper R, Ramirez G (1991).** Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur. J. Neurosci.* 3:559-569
- Quigley HA (1999).** Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 18:39-57.
- Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escibano J, Farinas I (2006).** Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci.* 9:331-339.
- Rickman DW, Bowes Rickman C (1996).** Suppression of trkB expression by antisense oligonucleotides alters a neuronal phenotype in the rod pathway of the developing rat retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:12564-12569.
- Robitzki AA, Mack A, Hoppe U, Chatonnet A, Layer PG (1998).** Butyrylcholinesterase antisense transfection increases apoptosis in differentiating retinal reagggregates of chick embryo. *J Neurochem.* 71:413-420.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA (1991).** Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 331:255-258.
- Rohrer B, Stell WK (1995).** Localization of putative dopamine D₂-like receptors in the chick retina, using *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Brain Res.* 695:110-116.
- Rohrer B, Korenbrot JI, LaVail MM, Reichardt LF, Xu B (1999).** Role of neurotrophin receptor TrkB in the maturation of rod photoreceptors and establishment of synaptic transmission to the inner retina. *J Neurosci.* 19:8919-8930.
- Roque RS, Caldwell RB, Behzadian MA.Cultured (1992).** Müller cells have high levels of epidermal growth factor receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33:2587-2595.
- Rothermel A, Willbold E, Degrip WJ, Layer PG (1997).** Pigmented epithelium induces complete retinal reconstitution from dispersed embryonic chick retinæ in reaggregation culture. *Proc Biol Sci.* 264:1293-1302.
- Rothermel A, Layer PG (2001).** Photoreceptors plasticity in reagggregates of embryonic chick retina: rod depends on proximal cones and on tissue organisation. *Eur J Neurosci.* 13:949-958.
- Rothermel A, Layer PG (2003).** GDNF regulates chicken rod photoreceptor development and survival in reaggregated histotypic retinal spheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:2221-2228.
- Rothermel A, Volpert K, Schlichting R, Huhn J, Stotz-Reimers M, Robitzki AA, Layer PG (2004).** Spatial and temporal expression patterns of GDNF family receptor $\alpha 4$ in the developing chicken retina. *Gene Expr Patterns.* 4:59-63.
- Rothermel A, Volpert K, Burghardt M, Lantzsich C, Robitzki AA, Layer PG.** Knock-down of GFR $\alpha 4$ expression by RNA interference affects the development of retinal cell types in three-dimensional histotypic retinal spheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:2716-2725.
- Rothermel A. (2000).** Die Retinosphäroidtechnologie als Modellsystem der Retinogenese: Der Einfluß von Müller- und Pigmentepithelzellen auf die Schichtenbildung und die Photorezeptordifferenzierung in der Retina des Huhns. Dissertation an der Technischen Universität Darmstadt.
- Saarma M, Sarola H (1999).** Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech.* 45:292-302.

- Sagar SM, Edwards RH, Sharp FR (1991).** Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha induce c-fos gene expression in retinal Muller cells in vivo. *J Neurosci Res.* 29:549-559.
- Salz A. (2006).** Eine in vivo und in vitro Studie der retinalen Entwicklung des Huhns: Hat GDNF einen Einfluss auf dopaminerge Amakrinzellen und Photorezeptoren? Diplomarbeit an der Technischen Hochschule Darmstadt.
- Sanger F, Aiv GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977).** Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* 265:687-695.
- Sanicola M, Hession C, Worley D, Carmillo P, Ehrenfels C, Walus L, Robinson S, Jaworski G, Wei H, Tizard R, Whitty A, Pepinsky RB, Cate RL (1997).** Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:6238-6243.
- Sariola H, Saarma M (2003).** Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci.* 116:3855-3862.
- Schober A, Hertel R, Arumae U, Farkas L, Jaszai J, Kriegelstein K, Saarma M, Unsicker K (1999).** Glial cell line-derived neurotrophic factor rescues target-deprived sympathetic spinal cord neurons but requires transforming growth factor-beta as cofactor in vivo. *J Neurosci.* 19:2008-2015.
- Seigel GM, Tombran-Tink J, Becerra SP, Chader GJ, Diloroto DA Jr, del Cerro C, Lazar ES, del Cerro M (1994).** Differentiation of Y79 retinoblastoma cells with pigment epithelial-derived factor and interphotoreceptor matrix wash: effects on tumorigenicity. *Growth Factors.* 10:289-297.
- Seki M, Tanaka T, Nawa H, Usui T, Fukuchi T, Ikeda K, Abe H, Tekei N (2004).** Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes.* 53:2412-2419.
- Sheedlo HJ, Nelson TH, Lin N, Rogers TA, Roque RS, Turner JE (1998).** RPE secreted proteins and antibody influence photoreceptor cell survival and maturation. *Brain Res Dev Brain Res.* 107:57-69.
- Sheedlo HJ, Li L, Gaur VP, Young RW, Seaton AD, Stovall SV, Jaynes CD, Turner JE (1992).** Photoreceptor rescue in the dystrophic retina by transplantation of retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol.* 138:1-49.
- Siegel GJ, Chauhan NB (2000).** Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Rev.* 33:199-227.
- Sieving PA, Caruso RC, Tao W (2006).** Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3896-3901.
- Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J (1993).** Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1526-1530.
- Slonimsky JD, Yang B, HINTERNEDER JM, Nokes EB, Birren SJ (2003).** BDNF and CNTF regulate cholinergic properties of sympathetic neurons through independent mechanisms. *Mol Cell Neurosci.* 23:648-660.
- Steinberg MS (1970).** Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. *J Exp Zool.* 173:395-433.
- Steinberg RH (1994).** Survival factors in retinal degenerations. *Curr Opin Neurobiol.* 4:515-524.
- Stoop R, Poo MM (1996).** Synaptic modulation by neurotrophic factors: differential and synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci.* 16:3256-3264.

- Szel A, Rohlich P (1985).** Localization of visual pigment antigens to photoreceptor cells with different oil droplets in the chicken retina. *Acta Biol Hung.* 36:319-324.
- Takei N, Numakawa T, Kozaki S, Sakai N, Endo Y, Takahashi M, Hatanaka H (1998).** Brain-derived neurotrophic factor induces rapid and transient release of glutamate through the non-exocytotic pathway from cortical neurons. *J Biol Chem.* 273:27620-27624.
- Tatard VM, Sindji L, Branton JG, Aubert-Pouessel A, Colleau J, Benoit JP, Montero-Menei CN (2007).** Pharmacologically active microcarriers releasing glial cell line - derived neurotrophic factor: Survival and differentiation of embryonic dopaminergic neurons after grafting in hemiparkinsonian rats. *Biomaterials.* 28:1978-1988.
- Tatar O, Adam A, Shinoda K, Stalmans P, Eckardt C, Luke M, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S (2006).** Expression of VEGF and PEDF in choroidal neovascular membranes following verteporfin photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol.* 142:95-104.
- Thoenen H (1995).** Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science.* 270:593-598.
- Tombran-Tink J, Johnson LV (1989).** Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30:1700-1707.
- Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV (1991).** PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res.* 53:411-414.
- Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E, Chader GJ (1996).** Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis.* 2:11.
- Tombran-Tink J, Barnstable CJ (2003).** PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci.* 4:628-636.
- Tombran-Tink J, Barnstable CJ (2003).** Therapeutic prospects for PEDF: more than a promising angiogenesis inhibitor. *Trends Mol Med.* 9:244-250.
- Tombran-Tink J (2005).** The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights into phylogeny, function, and signaling. *Front Biosci.* 10:2131-2149.
- Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A (1996).** Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 382:80-83.
- Trinka JP (1963).** Behavior of dissociated retinal pigment cells in heterotypic cell aggregates. *Ann N Y Acad Sci.* 100:413-435.
- Trupp M, Ryden M, Jörnvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez CF. (1995).** Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J. Cell Biol.* 130:137-148
- Trupp M, Scott R, Whittemore SR, Ibanez CF (1999).** Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem.* 274:20885-20894.
- Turner DL, Cepko CL (1987).** A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature.* 328:131-136.
- Turner BA, Sparrow J, Cai B, Monroe J, Mikawa T, Hempstead BL (2006).** TrkB/BDNF signaling regulates photoreceptor progenitor cell fate decisions. *Dev Biol.* 299:455-65.
- Vardimon L, Ben-Dror I, Havazelet N, Fox LE (1993).** Molecular control of glutamine synthetase expression in the developing retina tissue. *Dev Dyn.* 196:276-282.

- Varella MH, de Mello FG, Linden R (1999).** Evidence for an antiapoptotic role of dopamine in developing retinal tissue. *J Neurochem.* 73:485-492.
- Veraux-Botteri C, Martin-Martinelli E, Nguyen-Legros J, Geffard M, Vigny A, Denoroy L (1986).** Regional specialization of the rat retina: catecholamine-containing amacrine cell characterization and distribution. *J Comp Neurol.* 243:422-433.
- Vollmer G, Layer PG, Gierer A (1984).** Reaggregation of embryonic chick retina cells: pigment epithelial cells induce a high order of stratification. *Neurosci Lett.* 48:191-196.
- Volpert K (2002).** Zeitliche und räumliche Gen-Expression von GDNF und der GDNF-Rezeptor-Familie während der retinalen Entwicklung im Huhn. Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt.
- von Bartheld CS, Williams R, Lefcort F, Clary DO, Reichardt LF, Bothwell M (1996).** Retrograde transport of neurotrophins from the eye to the brain in chick embryos: roles of the p75NTR and trkB receptors. *J Neurosci.* 16:2995-3008.
- Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R (2000).** Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:927-936.
- Wang HH, Cuenca N, Kolb H (1990).** Development of morphological types and distribution patterns of amacrine cells immunoreactive to tyrosine hydroxylase in the cat retina. *Vis Neurosci.* 4:159-175.
- Wang Y, Smith SB, Ogilvie JM, McCool DJ, Sarthy V (2002).** Ciliary neurotrophic factor induces glial fibrillary acidic protein in retinal Muller cells through the JAK/STAT signal transduction pathway. *Curr Eye Res.* 24:305-312.
- Wang X, Iannaccone A, Jablonski MM (2005).** Contribution of Muller cells toward the regulation of photoreceptor outer segment assembly. *Neuron Glia Biol.* 1:1-6.
- Ward NL, Hagg T (2000).** BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. *Exp Neurol.* 162:297-310.
- Watanabe T, Raff MC (1992).** Diffusible rod-promoting signals in the developing rat retina. *Development.* 114:899-906.
- Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y (1997).** Survival of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals. *Clin Neurosci.* 4:233-239.
- Wetts R, Fraser SE (1988).** Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science.* 239:1142-1145.
- Willbold E, Rothermel A, Huhn J, Reinicke M, Layer PG (2001).** Cerebellar glia cells induce a correct laminar organization in chicken retinal reagggregates. *Cells Tissues Organs.* 169:104-112.
- Winkler C, Sauer H, Lee CS, Bjorklund A (1996).** Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 16:7206-7215.
- Wong WT, Rex TS, Auricchio A, Maguire AM, Chung D, Tang W, Bennett J (2004).** Effect of over-expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) on developing retinal vasculature in the mouse. *Mol Vis.* 10:837-844.
- Worby CA, Vega QC, Zhao Y, Chao HH, Seasholtz AF, Dixon JE (1996).** Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271:23619-22362.

Wulle I, Schnitzer J (1989). Distribution and morphology of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the developing mouse retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 48:59-72.

www.wikipedia.org

Xie HQ, Adler R (2000). Green cone opsin and rhodopsin regulation by CNTF and staurosporine in cultured chick photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:4317-4113.

Xu X, Zhang SS, Barnstable CJ, Tombran-Tink J (2006). Molecular phylogeny of the antiangiogenic and neurotrophic serpin, pigment epithelium derived factor in vertebrates. *BMC Genomics.* 7:248.

Yan Q, Wang J, Matheson CR, Urich JL (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol.* 38:382-390.

Yang XJ (2004). Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. *Sem Cell Dev Biol.* 15:91-103.

Zawilska JB, Bednarek A, Berezinska M, Nowak JZ (2003). Rhythmic changes in metabolism of dopamine in the chick retina: the importance of light versus biological clock. *J Neurochem.* 84:717-724.

Zhang Z, Miyoshi Y, Lapchak PA, Collins F, Hilt D, Lebel C, Kryscio R, Gash DM (1997). Dose response to intraventricular glial cell line-derived neurotrophic factor administration in parkinsonian monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 282:1396-1401.

Zhang CW, Lu Q, You SW, Zhi Y, Yip HK, Wu W, So KF, Cui Q (2005). CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but differential effects on nitric oxide synthase expression soon after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:1497-1503

Zihlmann KB, Ducray AD, Schaller B, Huber AW, Krebs SH, Andres RH, Seiler RW, Meyer M, Widmer HR (2005). The GDNF family members neurturin, artemin and persephin promote the morphological differentiation of cultured ventral mesencephalic dopaminergic neurons. *Brain Res Bull.* 68:42-53.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

Volpert KN, Rothermel A, Layer PG (2007). GDNF stimulates rod photoreceptors and dopaminergic amacrine cells in chicken retinale reagggregates. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* in Revision.

LEBENS LAUF

Name: Katja Eberhardt geb. Volpert
geboren am: 10. Februar 1977 in Wiesbaden
Staatangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schul Ausbildung:

1983-1987 Otto-Stückrath-Schule in Wiesbaden

1987-1996 Gutenbergschule in Wiesbaden, Abschluss Abitur

Studium:

1996-1999 Grundstudium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz, Abschluss Vordiplom

1999-2002 Hauptstudium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt, Abschluss Diplom

Februar-Mai 2001 Praktikum am *Department of Ophtalmology and Visual Science*, an der Yale University, New Haven, USA

Januar-Oktober 2002 Diplomarbeit im Bereich Entwicklungs- und Neurobiologie, TU-Darmstadt mit dem Thema: „Zeitliche und räumliche Gen-Expression von GDNF und der GDNF-Rezeptor-Familie während der retinalen Netwicklung im Huhn“

April 2003- Juni 2007 Promotion im Bereich Entwicklungs- und Neuroentwicklung, TU-Darmstadt mit dem Thema: „Die Retinogenese im dreidimensionalen Kultursystem des Huhns: Eine zell- und molekularbiologische Studie neurotropher Funktionen der Zytokine GDNF, BDNF und PEDF“

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Katja Eberhardt

Wiesbaden, den 20. Juni 2007